Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
der Universität Tübingen
Komm. Direktor: Professor Dr. med. F.W. Schmahl

# Einflußgrößen auf die aerosolinhalative Sensibilisierung von Ratten mit Berylliumsulfat und auf den Lymphozytentransformationstest als Nachweismethode

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HANS-ULRICH KRAUSS
aus Stuttgart

1983

UNIV.
LEIDEN
MED.

Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin
der Universität Tübingen
Komm. Direktor: Professor Dr. med. F.W. Schmahl

# Einflußgrößen auf die aerosolinhalative Sensibilisierung von Ratten mit Berylliumsulfat und auf den Lymphozytentransformationstest als Nachweismethode

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
HANS-ULRICH KRAUSS
aus Stuttgart

1983

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. med. G. Fichtner |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. H. Weichardt |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. P. A. Berg |
| 3. Berichterstatter: | Prof. Dr. med. H.- J. Gerth |

---

*gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen*

Meinen Eltern

Diese Arbeit entstand am Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Metallforschung in Stuttgart.

Herrn Professor Dr. med. Heinz Weichardt, emeritierter ordentlicher Professor und ehemaliger Direktor des Institutes für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen, der mir das Thema der Arbeit freundlicherweise überlassen hat, danke ich hierfür.

Herrn Obermedizinaldirektor Professor Dr. med. Hans Zorn, an dessen Forschungsstelle in Stuttgart die Versuche durchgeführt wurden, gilt mein Dank für seine großzügige und erfahrene Unterstützung.

Besonderen Dank sei Herrn Holger Diem für seine unermüdliche und konstruktive Hilfe und Einsatzbereitschaft zuteil.

Herrn Dr. Lützen bei der Fa. Thomae in Biberach sei für die Unterweisung in der retroorbitalen Blutentnahme bei Ratten und für die Durchführung von Vorversuchen gedankt.

Zu Dank verpflichtet bin ich ebenfalls Herrn Döbling, bei den Technischen Werken der Stadt Stuttgart, der die statistische Analyse erstellt hat, sowie all denen, die mir bei der Literaturbeschaffung, der Vorbereitung der Druckvorlage, dem Maschienenschreiben und der Korrektur, sowie dem Druck selbst, mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0054

INHALTSÜBERSICHT


I. EINLEITUNG 5

II. GESCHICHTLICHE, NATURWISSENSCHAFTLICHE UND MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON BERYLLIUM

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Beryllium und seine Eigenschaften | 7 |
| 2. | Geschichte der Berylliumverarbeitung und -verwertung | 7 |
| 3. | Industrielle und gesellschaftliche Bedeutung | 8 |
| 4. | Beryllium als krankheitsauslösender Faktor | 9 |
| 5. | Die Berylliose als arbeitsmedizinisches und toxikologisches Problem | 9 |
| 5.1. | Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung | 9 |
| 5.2. | Pathophysiologische Eigenschaften von Beryllium | 12 |
| 5.3. | Berylliumbedingte Krankheitsbilder und ihre Pathologie | 14 |
| 5.3.1. | Akute Rhinitis, Tracheitis und Bronchitis | 14 |
| 5.3.2. | Akute Berylliumvergiftung | 14 |
| 5.3.3. | Chronische Berylliose | 15 |
| 5.3.4. | Ekzematöse Kontaktdermatitis | 17 |
| 5.3.5. | Berylliumgeschwür | 17 |
| 5.3.6. | Subkutanes Berylliumgranulom mit zentraler Nekrose | 17 |

| | | |
|---|---|---|
| 5.3.7. | Granulomatöse Hautverletzung | 18 |
| 5.3.8. | Entzündliche, oedematöse und ulceröse Konjunktivitis und Corneitis | 18 |
| 5.3.9. | Beryllium als Karzinogen | 18 |
| 5.4. | Epidemiologische Beobachtungen | 19 |
| 5.5. | Arbeitsmedizinische Maßnahmen | 21 |
| 6. | Immunologische Aspekte | 23 |
| 6.1. | Die Berylliose als Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ | 23 |
| 6.2. | Diagnose und Differentialdiagnose | 25 |
| 6.3. | Immunologische Methoden | 27 |
| 6.3.1. | Der Makrophagen-Migrations-Hemmtest | 28 |
| 6.3.2. | Der Lymphozytentransformationstest | 28 |
| 6.3.2.1. | Methodik des LTT und seine Auswertung | 29 |
| 6.3.2.2. | Die Stellung des Lymphozyten im Immunsystem | 31 |
| 6.3.2.3. | Der aktivierte Lymphozyt | 34 |

III. VERSUCHSPLANUNG UND DURCHFÜHRUNG

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Fragestellung des Versuchs | 36 |
| 2. | Versuchsplanung | 36 |
| 2.1. | Übersicht | 37 |
| 3. | Durchführung des Versuchs | 4o |
| 3.1. | Exposition | 4o |
| 3.1.1. | Auswahl der Versuchstiere | 4o |
| 3.1.2. | Gewöhnung der Versuchstiere an ihre neue Umgebung | 4o |
| 3.1.2.1. | Unterhaltung | 4o |
| 3.1.2.2. | Das Käfigsystem | 41 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.1.3. | Berylliumexposition | 44 |
| 3.2. | Inkubation | 44 |
| 3.2.1. | Narkose | 44 |
| 3.2.2. | Blutabnahme | 46 |
| 3.2.3. | Der Lymphozytentransformationstest (LTT) | 48 |
| 3.2.3.1. | Ansetzen des Kulturmediums und Vorbereitung der Antigenkulturen sowie Vorbereitung der Stimulations- und Backgroundkontrolle | 49 |
| 3.2.3.2. | Menge und Verarbeitung des gewonnenen Blutes | 55 |
| 3.2.3.3. | Inkubation | 57 |
| 3.3. | Datengewinnung | 58 |
| 3.3.1. | Makroskopische und chemische Beurteilung der Kulturen | 59 |
| 3.3.2. | "Ernten" der Kulturen | 58 |
| 3.3.3. | Anfertigen der Ausstriche | 58 |
| 3.4. | Auswertung | 59 |
| 3.4.1. | Auszählen der Ausstriche | 59 |
| 3.4.1.1. | Technik | 59 |
| 3.4.1.2. | Qualitative Beurteilung | 62 |
| 3.4.1.3. | Quantitative Beurteilung | 62 |
| 3.4.1.4. | Kritik der qualitativen Auswertung durch das Mikroskop | 62 |
| 3.4.2. | Bilddokumentation | 66 |
| 3.4.3. | Ergebnisse | 71 |
| 3.4.3.1. | Quantitativer Vergleich der Stimulationsergebnisse der einzelnen Tiere und der Tiergruppen untereinander | 71 |
| 3.4.3.2. | Statistik | 75 |

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UNTER EINBEZIEHUNG DER EINFLUSSGRÖSSEN AUF DEN VERSUCH

1. Die Einflußgrößen 78

2. Diskussion 78

3. Zusammenfassung 88

V. TABELLEN UND SCHAUBILDER 89

VI. LITERATURVERZEICHNIS 1o4

# I. EINLEITUNG

Betrachtet man die Geschichte der Berylliumverarbeitung von Anfang dieses Jahrhunderts bis heute (32, 66) und die damit in Zusammenhang stehenden, von diesem Element und seinen Verbindungen ausgehenden Erkrankungen (2o, 55, 66, 79, 84, 99), so wird deutlich, daß etliche Irrtümer überwunden werden mußten, um zum heutigen Wissensstand über den Charakter dieser Erkrankungen zu gelangen (2o, 66). Lange Zeit gelang es nicht, einzelne Phänomene zu deuten, die rein toxikologisch nicht zu erklären waren (79). Ein Teil der von Beryllium ausgelösten Symptomatologie entzog sich einer klaren Dosis-Wirkung-Relation und man mußte außerdem feststellen, daß z.B. die chronische Berylliose mit einer möglichen Latenzzeit von über 2o Jahren nach der letzten Exposition auftreten kann (36).

Zur Klärung des Sachverhalts war die Hypothese von STERNER und EISENBUD sehr wertvoll, es könne sich dabei um eine immunologische Erkrankung handeln (79). Dieser Standpunkt konnte schließlich mit fortschreitender Entwicklung der immunologischen Technik untermauert werden (17, 39, 46, 54, 66, 68).

Neben der Erforschung der Epidemiologie wurde auch große Mühe darauf verwandt, Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Beryllium, sowie die Beeinflußung von Stoffwechselvorgängen aufzuklären (5, 5o, 56, 64, 65, 7o, 76, 8o, 87, 92, 1o6). Wegen der außerordentlich geringen krankheitsauslösenden Mengen und der oft klinisch mit anderen Krankheiten, wie z.B. der Sarkoidose, dem Hamman-Rich-Syndrom und der Lungentuberkulose verwechselbaren Befunde (2o, 44, 75, 81, 91), gilt bis heute der positive Berylliumnachweis im Gewebe als wertvoll bei einer stattgehabten Exposition (75, 82). Dieser ist aber leider in vielen Fällen nicht zu erbringen, und es muß daher auf einen ganzen Punkte-Katalog zurückgegriffen werden, um die Diagnose dennoch stellen zu können (15, 75, 82).

Dies ist um so mehr von allgemeinem Interesse, als in den letzten Jahren mit der Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten von Beryllium im Atomreaktorbau, in der Hitzeschildkeramik von Raumfahrzeugen, in Raketentreibstoffen und in der Halbleitertechnik eine Entwicklung stattgefunden hat, die einerseits immer mehr Menschen im Arbeitsprozeß und in dessen Umgebung mit dem Element in Kontakt treten läßt, andererseits aber auch die Beteiligung von Beryllium an Umweltkatastrophen möglich macht (66).

Neben wissenschaftlich begründeten gewerbehygienischen Maßnahmen sind daher sowohl die Überwachung potentiell Gefährdeter, als auch die Entwicklung einer zuverlässigen Diagnostik Erkrankter und / oder kontaminierter Personen wünschenswert. Zunächst glaubte man, in dem von CURTIS entwickelten Hauttest ein geeignetes Diagnostikum gefunden zu haben (15, 57, 91). Parallel zum zunehmenden Verständnis immunulogischer Vorgänge erfuhr man jedoch von der Gefahr einer Berylliose-Auslösung, bzw. einer Exazerbation durch den Hauttest und machte dem entsprechende Beobachtungen (33, 86, 97, 1o6).

Schließlich gelang es, mit verschiedenen immunulogischen Techniken die Berylliose als sogenannte Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ nachzuweisen (7, 39, 46, 1o6). In diesem Zusammenhang wurde der Lymphozytentransformationstest als ungefährlicher In-Vitro-Test bei Versuchstieren und Menschen eingesetzt (17, 3o, 37, 38, 39, 8o, 89).

Der vorliegende Versuch sollte dazu dienen, Technik und Störfaktoren des Lymphozytentransformationstestes im Kleinlabor zu untersuchen. Dies sollte mit Hilfe der Mikrovollblutmethode nach HEITMANN (37, 38) am Blut von Ratten vor und nach einer Langzeitexposition mit einem $BeSO_4$-Aerosol im doppelten ehemaligen MAK-Bereich erfolgen, wobei besondere technische Anordnungen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen evtl. mangelnder immunologischer Reaktion und möglichen Expositionsfehlern gerade bei dieser Spezies ausschließen sollten.

# II. GESCHICHTLICHE, NATURWISSENSCHAFTLICHE UND MEDIZINISCHE BEDEUTUNG VON BERYLLIUM

## 1. Beryllium und seine Eigenschaften

Als erstes Element in der zweiten Hauptgruppe des Periodensystems gehört Beryllium zu den sogenannten Erdalkalielementen und Leichtmetallen. Es tritt zweiwertig auf und ist mit einem Atomgewicht von 9, 0122 nach Wasserstoff, Helium und Lithium das viertleichteste Element (45).

Der Name rührt von Beryll, einem stark lichtbrechenden hexagonal wachsenden Halbedelstein mit der Summenformel 3 BeO $Al_2O_3$ - 6 $SiO_2$ her. Seine frühere Verwendung als Lesestein und als Augengläser erklärt das deutsche Wort "Brille" (9).

Der Schmelzpunkt des Metalls beträgt 1 283° C. Seine Vorteile liegen neben seiner Leichtigkeit in einer bemerkenswerten Stabilität, einer hohen Härte und Duktilität, sowie bei Legierungen in einer starken mechanischen Beanspruchbarkeit ohne Materialermüdung, hohen Korrosionsschutz, Funkensicherheit und Hochtemperaturfestigkeit. In keramischen Verbindungen hält es als Berylliumoxyd mit einem Schmelzpunkt von 2 530°C hohen thermischen Belastungen stand (9, 47, 45)

Bei Beschuß mit Alpha-Teilchen entwickelt es sich zur Neutronenquelle. Es ist ferner auch als Neutronenbremse und Neutronenspiegel einsetzbar (32, 66).

## 2. Geschichte der Berylliumverarbeitung und -verwertung

Wie oben erwähnt wurde Beryll bereits vor dem 13. Jahrhundert in Deutschland als Lesestein und zur Herstellung von Augengläsern ver-

wendet. Außerdem ist Beryllium in den Edelsteinen Smaragd, Aquamarin, Goldberyll, Heliodor und Morganit enthalten und wurde dem entsprechend als Schmuck verarbeitet (9). Aus Beryll wurde erstmals 1798 von VAQUELIN Berylliumoxyd, 1828 dann von WÖHLER über Berylliumchlorid das Metall selbst dargestellt (66, 75).

In den 2oer Jahren wurde Beryllium in der Schwachstromtechnik und in Rechenmaschinen als Kupferlegierung eingesetzt. In den Jahren danach wurde es zur Herstellung von Flugzeugmotoren und Präzisionsinstrumenten verwendet. Ab 1938 diente es als Zink-Beryllium-Silikat zum Bau von Leuchtstoffröhren (72). Ferner wurde es Bestandteil von Funkröhren, Glühfäden, Heizkathoden und Flugzeugteilen.

In den letzten Jahren und Jahrzehnten fand Beryllium zusätzlich Verwendung als Neutronenquelle, -spiegel und -bremse in Kernreaktoren, als Raketentreibstoff und als Hitzeschild von Raumfahrzeugen (Space-Shuttle) (32, 47, 66).

## 3. Industrielle und gesellschaftliche Bedeutung

Die unter Punkt 1 aufgeführten Eigenschaften von Beryllium erklären seine industrielle Bedeutung (Vgl. 2.).
Die vermehrte Verwendung in der Industrie zieht jedoch weitreichende gesellschaftliche Konsquenzen nach sich. Durch den allgemein möglichen Kontakt mit Beryllium sind nunmehr nicht nur die in der Berylliumindustrie tätigen Arbeiter, sondern die gesamte Öffentlichkeit als potentiell berylliumgefährdet zu betrachten.

So sind heute neben arbeitsmedizinischen Gefahren und Problemen auch berylliumbedingte Umweltkatastrophen in den Bereich des Vorstellbaren gerückt, die es unter allen Umständen zu vermeiden gilt. (66)

## 4. Beryllium als krankheitsauslösender Faktor

Die Geschichte berufsbedingter Berylliumerkrankungen ist an anderer Stelle bereits ausführlich beschrieben worden (16, 28, 32, 36, 59, 72, 79). Es sei hier nur erwähnt, daß zwar bereits in den 3oer Jahren aus Deutschland, Italien und der UdSSR über Lungen- und Hautschäden in Zusammenhang mit $BeF_2$ berichtet wurde, aber erst Mitte bis Ende der 4oer Jahre in den USA in Zusammenhang mit der Verwendung von Beryllium in der Leuchtstoffröhrenindustrie stehende Erkrankungen eindeutig Beryllium zugesprochen und schließlich als Berufskrankheit anerkannt wurden (72).

Es wurden eindeutige Sicherheitsmaßnahmen ergriffen (1o1, 66, 1o2) und außerdem zur besseren epidemiologischen Erforschung das US-Beryllium-Case-Registry gegründet (28). Nach 1954 wurde Beryllium in der Leuchtstoffröhrenindustrie so gut wie nicht mehr verwendet. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang berylliumbedingter Erkrankungen, bis die Produktion durch die erweiterten Einsatzgebiete (s.o.) angestiegen ist (66).

## 5. Die Berylliose als arbeitsmedizinisches und toxikologisches Problem

### 5.1. Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung

Gemäß den entsprechenden Arbeitsprozessen können Beryllium und Berylliumverbindungen am ehesten in Form von Stäuben oder als Nebel mit dem menschlichen Organismus in Wechselwirkung treten. Auch eine akzidentelle perkutane Inokulation von Berylliumverbindungen und metallischem Beryllium ist möglich.

Die Lunge stellt auf Grund ihrer größeren Oberfläche gegenüber der Haut das wichtigste Resorptionsorgan dar (1o4). Gastrointestinal

wird Beryllium so gut wie nicht resorbiert (80).

Im Tierexperiment nimmt bei Inhalationsversuchen die intrapulmonale Beryllium-Menge von in lungengängiger Teilchengröße applizierten Aerosolen und Stäuben ab, um im alveolären Bereich wieder anzusteigen (104).

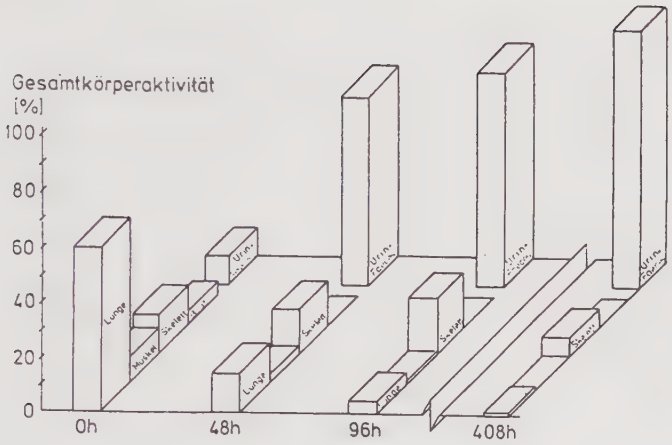
Wegen des amphoteren Charakters des Berylliumatoms ist zur Lösung seiner Salze in Wasser ein saurer pH notwendig. Bei Tierversuchen mit Salzaerosolen ist daher zu beachten, daß bei der Pufferung im intraalveolären Milieu Beryllium als schwerlösliches Hydroxid oder Phosphat gefällt wird. Die Entstehung eines Kolloides oder die Bildung kleinster Partikel macht diese Art von Exposition der staubförmiger Partikel im neutralen Bereich vergleichbar. Allerdings ist die intraalveoläre Reizung durch den pH-Abfall bei Überlastung des Puffersystems zu beachten (65).

REEVES stellte bei der $BeSO_4$-Aerosolinhalation von Ratten eine bis zur 36. Woche ansteigende Berylliummenge in der Lunge mit einem nachfolgenden Plateau fest, welches mit einem Gleichgewicht zwischen der Berylliumaufnahme und dem Abtransport gelösten Berylliums in Blut und Lymphknoten erklärt wird.

Die Berylliummenge in den tracheobronchialen Lymphknoten durchläuft ein Maximum in der 52. Woche (65).

ZORN und Mitarbeiter fanden nach 3-stündiger $^7BeSO_4$-Aerosol-Exposition von Ratten folgende Zusammenhänge (100):

Schaubild 1




Neben einer gewissen Berylliumretention in der Lunge wurde, wie bei CLARY (11) eine deutliche Speicherwirkung des Skeletts gefunden. Die Eliminierung des Berylliums aus der Lunge erfolgt nach einer logarithmischen Funktion (s.A.) mit mindestens zwei Konstanten. Dies deutet auf zwei sich überlagernde Speichermechanismen hin:

Formel 1: $$c_{Be} = e^{-k_1 t} + e^{-k_2 t}$$

$c_{Be}$ : Konzentration Be

$t$ : Zeit

$k_1, k_2$: Konstanten

In Urin und Faeces konnten mehr als 99% des aufgenommenen Berylliums nachgewiesen werden.

Beim Menschen konnte KLEMPERER 1951 bei Messungen an 2o Patienten mit chronischer Lungenberylliose bei 12 Patienten Beryllium im Urin nachweisen. Bei manchen sogar noch 1o Jahre nach der letzten Exposition. Bei gesunden Arbeitern, die an vergleichbaren Arbeitsplätzen gearbeitet hatten, fand sich eine vergleichbare Urin-

ausscheidung von Beryllium (5o).

STIEFEL konnte zeigen, daß Beryllium in Abhängigkeit von der applizierten Menge im Blut bis zu ca. 7O% an Praealbumin und bis zu ca 35% an Gammaglobulin gebunden vorliegt. Im Bereich der Allgegenwartskonzentration findet sich Beryllium zu ca. 8% an Praealbumin und ca. 6o% an Gammaglobulin gebunden (8o).

Neben dem Durchtritt durch die alveoläre-kapillarendotheliale Membran werden berylliumhaltige Praezipitate in den Lysosomen von Makrophagen gefunden, von wo sie teils in gelöster Form auf den Lymphwegen zu den tracheobronchialen Lymphknoten und ins Blut weitertransportiert werden. Auch in den Alveolarzellen findet sich Beryllium und es wird eine Anlagerung in die Zellkerne angenommen (36, 65, 73, 77).

## 5.2. Pathophysiologische Eigenschaften von Beryllium

In der Anfälligkeit gegenüber der krankheitsauslösenden Wirkung konnten Geschlechtsunterschiede festgestellt werden. Bei der Auswertung der US-Beryllium-Case-Registry fand DE NARDI eine höhere Krankheitsrate für die chronische Berylliose bei Frauen (16, 28, 59).

Tierexperimentell wurde bei Ratten, Hamstern und Mäusen eine verminderte Lungenclearence für Beryllium-Staubpartikel bei weiblichen Tieren konstatiert. Bei weiblichen Ratten erfolgte die Entwicklung von Alveolarzellkarzinomen früher als bei den männlichen Tieren (11, 64, 65, 76, 84).

Hinsichtlich ihrer karzinogenen Potenz bei Tieren wurden dem Beryllium chemisch vergleichbare Verbindungen unter denselben Versuchsbedingungen untersucht. Dabei erwies sich nur Beryllium als krebsauslösend, d.h. es liegt diesbezüglich eine biochemische Besonderheit vor (66).

Bemerkenswert sind auch zahlreiche Beobachtungen, welche eine deutliche Abhängigkeit der pathogenen Wirkung von Berylliumoxid von der Herstellungstemperatur zeigen (29). Das bei 4oo° C kalzinierte Oxid besitzt die höchste Pathogenität, die geringste Partikelgröße bei poröser Oberfläche gegenüber dem bei 1 4oo° C gebrannten Oxid mit glatter Oberfläche und etwas höherer Partikelgröße, mit welchem tierexperimentell keine Granulone mehr erzeugt werden konnten.

Geht man bei der Betrachtung des Pathomechanismus berylliumbedingter Krankheiten davon aus, daß die Verfügbarkeit des $Be^{++}$-Ions im Organismus zu weiteren Reaktionen zur Verfügung stehen muß, so liegt ein entscheidender Unterschied zwischen den bei verschiedenen Temperaturen gebrannten Oxiden in der relativ größeren Löslichkeit, bzw. Hydroxidbildungsfähigkeit des niedergebrannten Oxids bei einer langen Verweildauer beider insgesamt schwerlöslichen Komponenten (12, 13, 19, 66, 73).

Wie bereits oben erwähnt, reichert sich das eingeatmete Beryllium zunächst in den Lysosomen der Alveolarzellen (35) an und erreicht schließlich die Zellkerne. Hier wird die Reduplikation der DNS gehemmt (64, 65, 66, 74, 96). Zahlreiche Enzymsysteme werden unter Beryllium-Einfluß gehemmt, wobei unter anderem die Konkurrenz zwischen Beryllium und Magnesium an den Bindungsstellen beobachtet wurde. Betroffen sind u.a. die alkalische Phosphatase, die Phosphoglucomutase, die Adenosintriphosphatase und die Desoxythymidinkinase (7o, 8o).

In Abhängigkeit vom chemischen Zustand, Tierspezies und Applikationsweise wird die letale Dosis mit 1,o mg/kg Körpergewicht für die intratracheale Gabe von $BeSO_4$ beim Affen und mit 5 ooo mg/kg für die subkutane Verabreichung von $BeCl_2$ bei der Ratte angegeben (31, 48, 49, 78).

## 5.3. Berylliumbedingte Krankheitsbilder und ihre Pathologie

Die unten aufgeführten Krankheitsbilder sind nach STERNER und EISENBUD (79) dargestellt. Auffallend ist, daß sich zwei Gruppen wesentlich voneinander unterscheiden lassen:

Einmal Krankheitsformen, die sich mit der Wirkung von anderen industriell verwendeten Reizstoffen wie z.B. Stickoxiden oder Metalldämpfen und auch Hautreizstoffen in ihrer Erscheinungsform und einer Dosis-Wirkungs-Relation vergleichen lassen.

Zum anderen die chronische Berylliose, die ohne erkennbare Dosis-Wirkungs-Relation mit einer Latenzzeit von Monaten bis über 2o Jahren auftreten kann. Die mit ihr einhergehenden Veränderungen wurden erstmalig 1951 von STERNER und EISENBUD als Zeichen einer Autoimmunkrankheit gedeutet (79).

### 5.3.1. Akute Rhinitis, Tracheitis und Bronchitis

Diese Krankheitsbilder äußern sich durch allgemeine Schleimhautentzündung, Erythem, Oedem, erhöhte Vulnerabilität und Blutungsneigung. Hauptsächlich traf man sie in der Erzverarbeitung bei 25% der direkt befaßten Arbeiter an, insbesondere im Zusammenhang mit $BeSO_4$, $BeF_2$ und $BeNH_4F$. Die Krankheit tritt sofort bis schleichend mit einer Dauer von 7 bis 28 Tagen bei Expositionskarenz ein. Die Reizungen sind dosisabhängig und im allgemeinen mit anderen industriellen Reizstoffen vergleichbar.

### 5.3.2. Akute Berylliumvergiftung

Eine akute (toxische) Berylliumvergiftung wird durch Einatmung löslicher Berylliumsalze wie $BeSO_4$, $BeF_2$, $BeNH_4F$ aber auch BeO in

einer Menge von mindestens 45 µg Be bei einer Dauer von 2o Minuten hervorgerufen.

Bereits wenige Stunden, z.T. auch erst längere Zeit nach der Inhalation traten die Symptome auf. Bei frühem Einsetzen der Pneumonitis kommt es häufig innerhalb weniger Tage zu einem tödlichen Verlauf. Bei weniger perakuten Verläufen kann mit der Genesung nach 1 bis 12 Wochen gerechnet werden.

Symptomatisch für dieses Krankheitsbild ist eine akute Pneumonitis mit zunehmender Dyspnoe, retrosternalem Schmerz und Enge, Husten, Zyanose und Gewichtsverlust. Die Vitalkapazität ist vermindert, der Puls erhöht, die Temperatur im allgemeinen normal. Ansonsten ist diese Erscheinung von Pneumonitiden durch andere Reizstoffe nicht zu unterscheiden.

Histologisch finden sich die Zeichen einer Pneumonitis mit intraalveolärer und interstitieller Fibroplastenproliferation. Im intraalveolären Exsudat zeigen sich vorwiegend Plasmazellen und Lymphozyten, seltener polymorphkernige Zellen.

Röntgenologische Befunde weisen eine peribronchiale Verschattung und punktförmige Infiltrate in den unteren Lungenabschnitten, teils auch eine ausgedehnte Verschattung über der gesamten Lunge auf.

Betroffen waren in der Erzverarbeitung (um 195o in den USA) bis über 1o% der Arbeiter, bei der Kalzinierung von BeO bei niedrigen Temperaturen bis 3o% und in der Leuchtstoffröhrenindustrie o,1 bis o,2% der berylliumexponierten Arbeiter.

### 5.3.3. Chronische Berylliose

Die chronische Berylliose tritt als chronische Lungengranulomatose mit Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Ermüdbarkeit, zunehmender Atemnot und unproduktivem Husten auf. Außerdem sind verminderte

Vitalkapazität, Zyanose, Trommelschlegelfinger und zunehmende kongestive Rechtsherzinsuffizienz als weitere Symptome bekannt.

Röntgenologisch finden sich eine gleichmäßige Verteilung feiner Granulationen bis hin zu diffuser retikulärer Zeichnung mit bestimmten Bereichen großknotiger Veränderungen. Das Bild gleicht dem der Boeck'schen Sarkoidose.

Histologisch zeigen sich fokale granumolatöse Reaktionen, welche sich aus Epitheloidzellen zusammensetzen und zuweilen auch vielkernige Riesenzellen aufweisen. Zum Teil tritt eine zentrale Nekrose auf, z.T. eine Sklerosierung und Hyalinisierung. Ähnliche Granulome finden sich in den regionalen Lymphknoten und zuweilen auch in Leber, Milz und in der Haut. Bei Weichteilverletzungen, wie sie insbesondere durch defekte Leuchtstoffröhren entstanden, kam es zu Granulombildungen im Wundbereich und damit zu einer verzögerten Wundheilung.

Die Berylliose war in der erzverarbeitenden Industrie zwischen o,1 und o,3% verbreitet. In der Leuchtstoffröhrenindustrie abhängig vom Berylliumgehalt des Leuchtphosphors bis zu 4% und in den sogenannten Nachbarschaftsfällen zu 1%.

Die auslösenden Verbindungen sind Berylliumoxid und Zink-Beryllium-Magnesium-Silikat.

Die Erkrankung kann sich direkt im Anschluß an eine akute, toxische Berylliumpneumonitis (63), nach langjähriger sehr geringer Exposition oder einige Monate bis über 2o Jahre nach der Exposition entwickeln (11, 36). Im allgemeinen verbleibt die Krankheit im aktiven Stadium, bessert sich nur zuweilen leicht oder schreitet bis zur infausten Prognose fort, wenn nicht durch Therapie mit Kortikosteroiden ein Stillstand erzielt werden kann.

Mit den sonst bekannten chronischen gewerbehygienischen Vergiftungen ist diese Krankheit nicht vergleichbar.

### 5.3.4. Ekzematöse Kontaktdermatitis

Die ekzematöse Kontaktdermatitis trat bei über 25% neueingestellter Arbeiter (79) bei Kontakt mit $BeF_2$ auf. Ferner auch bei Kontakt mit anderen löslichen Verbindungen wie $BeSO_4$ und $BeNH_4F$. Sie tritt frühestens drei Tage nach dem Kontakt, aber sonst in den ersten Wochen danach auf. Sie unterscheidet sich nicht von den anderen bekannten Kontaktdermatitiden, ausgelöst von hautreizenden, sensibilisierenden und allergisierenden Verbindungen.

### 5.3.5. Berylliumgeschwür

Das Berylliumgeschwür der Haut entsteht an kontaminierten Hautverletzungen, ist schwerheilend und schmerzlos.

Histologisch zeigt sich eine oberflächliche Fremdkörperreaktion der Haut mit epithelialer und fibroblastischer Proliferation.

Das Geschwür entsteht Tage bis Wochen nach der Verletzung, vornehmlich nach $BeF_2$-Kontakt, auch noch nach Abheilung der Hautlaesion und hält bis zu Monaten an.

### 5.3.6. Subkutanes Berylliumgranulom mit zentraler Nekrose

Das subkutane Berylliumgranulom mit zentraler Nekrose trat nach Berylliuminokulationen der Haut, allerdings nicht nur an der betreffenden Stelle, auf. In der Leuchtstoffröhrenindustrie trat es nach ca. zwei bis vier Monaten nach der Inokulation auch metallischen Berylliums auf. Das nur sporadische Auftreten und die lange Latenzzeit sind nicht typisch für "inerte" Fremdkörperreaktionen.

### 5.3.7. Granulomatöse Hautverletzungen

Diese Hautverletzungen bei Patienten mit chronischer Berylliose stehen mit den entsprechenden Lungenveränderungen in Beziehung, sind relativ selten und treten Monate bis Jahre nach der ersten Berylliumexposition auf (79).

### 5.3.8. Entzündliche, oedematöse und ulceröse Konjunktivitis und Corneitis

Die entzündliche, oedematöse und ulceröse Konjunktivitis und Corneitis, insbesondere bei der Erzverarbeitung, entspricht ungefähr der Häufigkeit des Auftretens der Kontaktdermatitis.

### 5.3.9. Beryllium als Karzinogen

In einigen Tierversuchen wurde eine karzinogene Potenz von Beryllium festgestellt (64, 65, 95). REEVES gab an, daß nach einer $BeSO_4$-Aerosolininhalation an Ratten nach 13 Monaten bei 100% der Tiere Lungenkarzinome aufgetreten seien. Die Überprüfung der histologischen Schnitte ließ jedoch Zweifel an der Diagnose aufkommen. Wahrscheinlich handelte es sich um ausgedehnte Granulome am Hilus.

GARDNER fand bereits 1966 Osteosarkome an Kaninchen nach intravenöser Berylliumverabreichung (23). SHEPPERS (76) beschrieb ein Alveolarzellkarzinom bei einem Affen in Zusammenhang mit Berylliumexpositionen. Bei Meerschweinchen hingegen wurden keine berylliuminduzierten Tumore gefunden, dagegen fanden sich jedoch ausgeprägte immunologische Veränderungen.

Beim Menschen konnte epidemiologisch kein Zusammenhang zwischen Lungenkrebs und Berylliumverbindungen gefunden werden (40, 104). Die Annahme von BERENDT (6), daß ein vermehrtes Karzi-

nomrisiko bei Patienten mit bereits vor der Berylliumexposition bestehenden Lungenerkrankungen vorliegt, konnte nicht bestätigt werden (4o).

## 5.4. Epidemiologische Beobachtungen

In der Zeit von 1938 bis 1944 traten in Deutschland bei der Herstellung von berylliumhaltigen Raketentreibstoffen mehrere, teils tödliche Berylliumpneumonitiden auf.

Als in den USA in den 4oer Jahren Krankheitsfälle im Zusammenhang mit Beryllium in zunehmendem Maße Interesse auf sich lenkten, waren diese bei Arbeitern und Angestellten in der berylliumgewinnenden Industrie aufgetreten. Hier waren Expositionen mit besonders hohen Berylliumkonzentrationen gegeben. Die häufigste Erkrankung war seinerzeit die "chemische Pneumonitis". Todesfälle waren relativ selten (66, 9o).

Die zweite Gruppe, die betroffen war, arbeitete in der Leuchtstoffröhrenproduktion, wo nicht nur im industriellen Maßstab produziert wurde, sondern in vielen kleinen Familienbetrieben Leuchtreklameröhren hergestellt und repariert wurden. Dabei wurde der Leuchtstoff ($ZnBeMg(SiO_4)M_7$) im Brennofen selbst unter Zugabe von bis zu 12% Berylliumoxid gebrannt. Nach der Pulverisierung wurden die Glasröhren an der Innenseite mit dem Staub beschichtet, die schließlich in einer Glasbläserarbeit z.T. direkt mit dem Mund in die richtige Form geblasen wurden. In dieser Gruppe wiesen bis zu 8% der untersuchten Arbeiter Zeichen der chronischen Ber ylliose auf. Verwirrend war, daß relativ geringe Berylliummengen mit unterschiedlicher Latenzzeit und ohne klare Dosis-Wirkungs-Beziehung zur Auslösung der Erkrankung führten.

Die dritte Gruppe umfaßt die sogenannten Nachbarschaftsfälle, bei denen die Betroffenen nicht im Arbeitsprozeß mit Beryllium in Kon-

takt kamen, sondern in der Nähe eines berylliumverarbeitenden Betriebes wohnten oder die Arbeitskleidung des Ehemannes wuschen. Zu dieser Gruppe gehören auch Kinder, die sich an zerbrochenen Neonröhren verletzten (66, 75, 79, 81, 84, 103).

Waren zur Auslösung einer akuten chemischen Pneumonitis 45 µg Beryllium innerhalb von 20 Minuten nötig, so genügten hier zur Auslösung der chronischen Berylliose im Abstand von bis zu 1,2 km vom berylliumverarbeitenden Betrieb eine ständige Luftverunreinigung von nur 0,01 - 0,1 µg/$m^3$ Beryllium. 1‰ der in dieser Entfernung lebenden Personen war betroffen. Hierbei war eine Dosis-Wirkungs-Beziehung insofern zu beobachten, als entsprechend der höheren Berylliumkonzentration (1 µg/$m^3$) in nächster Nähe des Betriebes das Risiko zu erkranken auf ca. 1% anstieg. Im Betrieb jedoch, wo Expositionen im Milligrammbereich auftraten, erkrankten lediglich 6 von 1 700 Angestellten, also 35‰, an chronischer Berylliose, wohingegen die akute chemische Pneumonie bei ca. 10% der Angestellten auftrat (79).

Im Falle der Verletzungen mit Neonröhren war das Auftreten von Granulomen und langwierigen, schwerheilenden Ulcerationen für eine toxische Verunreinigung ungewöhnlich (66).

Anzumerken ist, daß vielleicht mehrere Fälle auf Grund der röntgenologischen Ähnlichkeit mit metastierenden Neoplasien, Miliartuberkulose, Lungenfibrose und besonders Sarkoidose fehldiagnostiziert wurden und so der Aufmerksamkeit entgingen (75). Dies dürfte bei den nicht arbeitsmedizinisch überwachten, außerbetrieblichen Erkrankungsfällen bis heute der Fall sein, wenn man unterstellt, daß Personen im allgemeinen, täglichen Bereich mit Beryllium in Kontakt kommen, bzw. durch Luftverunreinigung belastet sein können.

## 5.5. Arbeitsmedizinische Maßnahmen

In Deutschland, Italien und den USA wurden nach der Erkennung der Toxizität des Berylliums verschiedene Schutzmaßnahmen durchgeführt. Weiterhin wurden alle Geräte und Apparaturen zur Arbeit mit Beryllium in geschlossene Einheiten zum Schutze der arbeitenden Belegschaft eingebracht. Das Beryllium wurde nicht mehr zur Herstellung von Leuchtstoffröhren benutzt. Das US-Beryllium-Case-Registry wurde 1952 gegründet, um weitere epidemiologische Daten zu sammeln und einen Überblick über die auftretenden Krankheitsfälle zu bekommen, bzw. die Wirkung arbeitsmedizinischer Maßnahmen überprüfen zu können.

1975 wurde Beryllium mit 2 $\mu g/m^3$ als niedrigsten Wert in die Liste der Treshold Limits Values eingetragen (66).

Die Air Quality Standards wurden für Beryllium auf o,o1 $\mu g/m^3$ festgesetzt. Die Public Emergency Limits (PEL) regeln die Lagerung, Transport und Handhabung gefährlicher Stoffe. Sie wurden für Beryllium auf 1oo $\mu g/m^3$/1o min festgesetzt. Bei länger andauernden Luftverunreinigungen wird die Konzentration entsprechend niederer berechnet. Eine Konzentrationserhöhung bei kürzerer Verunreinigung ist nicht zulässig (66).

Diese Maßnahmen entsprechen im wesentlichen den o.g. Erkenntnissen von STERNER und EISENBUD (79).

Ferner wurden betriebliche Maßnahmen eingeführt, die neben einem sogenannten Einstellungskatalog, in dem diejenigen Krankheiten und Beschwerden aufgeführt sind, welche mit einer Einstellung nicht vereinbar sind, auch genaue Vorschriften zu Einstellungs- und Kontrolluntersuchungen umfaßten (1o2).

In der BRD galt bis 1973 ebenfalls ein MAK-Wert (4) von 2 $\mu g/m^3$. Dann wurde Beryllium und 32 weitere Stoffe (oder Stoffgruppen) von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeits-

stoffe aus dem Abschnitt II entfernt und im Abschnitt III unter Gruppe A 2 aufgeführt, d.h. in der Gruppe derjenigen Stoffe, welche bislang nur im Tierversuch sich nach Meinung der "Kommission eindeutig als carzinogen erwiesen haben, und zwar unter Bedingungen, die der möglichen Exponierung des Menschen am Arbeitsplatz vergleichbar sind, bzw. aus denen Vergleichbarkeit abgeleitet werden kann." (4o).

Dadurch wird eine intensivere Überwachung, d.h. regelmäßige Kontrollen der Luft am Arbeitsplatz, sowie Untersuchungen des Blutes, Urins und der Faeces auf Beryllium vorgeschrieben. Ferner ist Beryllium in der TRK-Liste ("Technische Richtkonzentration") aufgeführt. Es ist beim Schleifen von Berylliummetall- und -legierungen ein Wert von o,oo5 mg/$m^3$ und im übrigen von o,oo2 mg/$m^3$ festgesetzt. "Unter der Technischen Richtkonzentration (TRK) eines gefährlichen Arbeitsstoffes versteht man diejenige Konzentration als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft, die als Anhalt für die zu treffenden Schutzmaßnahmen und die meßtechnische Überwachung am Arbeitsplatz heranzuziehen ist. Technische Richtkonzentrationen werden nur für solche gefährlichen Arbeitsstoffe benannt, für die z.Z. keine toxikologisch-arbeitsmedizinisch begründeten maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK-Werte) aufgestellt werden können. Die Einhaltung der Technischen Richtkonzentration am Arbeitsplatz soll das Risiko einer Beeinträchtigung der Gesundheit vermindern, vermag dieses jedoch nicht vollständig auszuschließen.
Die Technische Richtkonzentration orientiert sich an den technischen Gegebenheiten und den Möglichkeiten der technischen Prophylaxe unter Heranziehung arbeitsmedizinischer Erfahrungen im Umgang mit dem gefährlichen Arbeitsstoff. Da bei Einhaltung der Technischen Richtkonzentration das Risiko einer Beeinträchtigung der Gesundheit nicht vollständig auszuschließen ist, sind durch fortgesetzte Verbesserungen der technischen Gegebenheiten und der technischen Schutzmaßnahmen Konzentrationen anzustreben, die möglichst weit unterhalb der Technischen Richtkonzentration liegen.

Technische Richtkonzentrationen bedürfen der stetigen Anpassung an den Stand der technischen Entwicklung und der analytischen Möglichkeiten sowie der Überprüfung nach dem Stand der arbeitsmedizinischen Kenntnisse." (4o).

"TRK-Werte sind Grenzwerte, die von den Erwartungswerten der Konzentration über 1 Jahr (Jahresmittelwerte) nicht überschritten werden dürfen. Dabei wird vorausgesetzt, daß die Einwirkung täglich in der Regel nicht länger als acht Stunden und wöchentlich nicht länger als 4o Stunden - in Vierschichtbetrieben 42 Stunden pro Woche im Durchschnitt von vier aufeinanderfolgenden Wochen dauert." (4o).

## 6. Immunologische Aspekte

### 6.1. Die Berylliose als Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ

Wie einige andere Stoffe weist Beryllium die in Kapitel 5 aufgeführten Vergiftungssymptome bei Exposition gegenüber höheren Berylliumkonzentrationen auf. Im Gegensatz dazu tritt die Berrylliose mit einer Latenzzeit von 1 bis zu 2o Jahren nach Exposition mit relativ niedrigen Berylliumkonzentrationen, bzw. nach einer akuten Berylliumvergiftung auf. Ferner ist die von DE CURTIS beobachtete Hautreaktion bemerkenswert, welche nach 3 bis 1o Tagen auftritt, und nach erneuter Exposition in Kürze reproduzierbar ist (14), somit eine Sensibilisierung des Organismus auf Beryllium anzeigt. Teilweise werden auch granulomatöse Überempfindlichkeitsreaktionen festgestellt.

Bereits 1951 äußerten STERNER und EISENBUD die Vermutung, daß die chronische Berylliose eine Art Autoimmunerkrankung sei, die nur gewisse empfindliche Personen ergreift (79). 197o vertrat HANIFIN die These, die granulomatöse Überempfindlichkeit auf Beryllium entspreche einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (3o)

Im Tierexperiment konnte diese verzögerte Reaktion auf Beryllium reproduziert werden und beim Meerschweinchen sogar passiv mit Hilfe lyphoider Zellen übertragen werden.

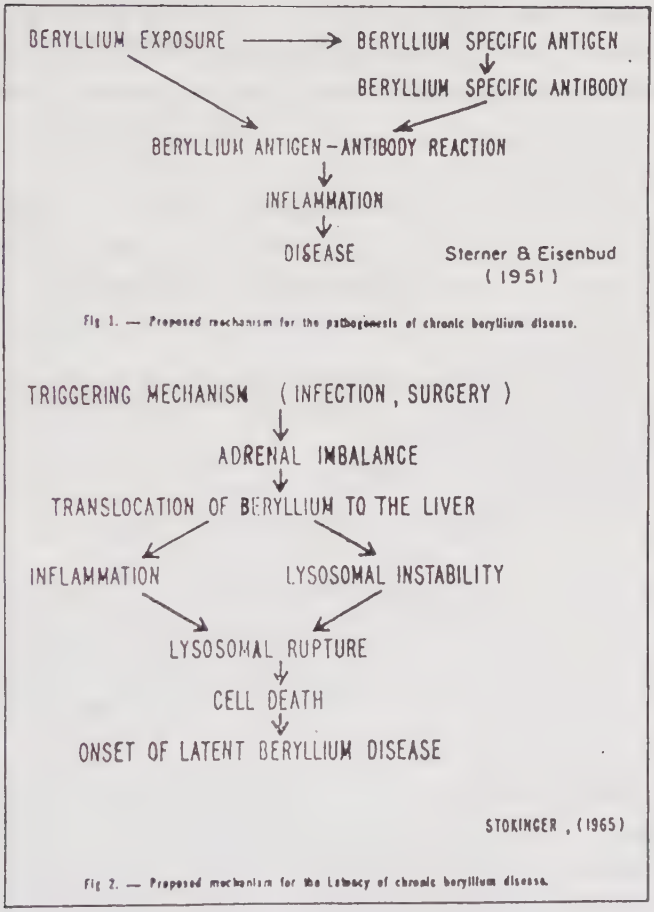
Es wurden weiterhin Gammaglobulinerhöhungen beim Mensch und Tier mit Berylliose beobachtet. Sie deutet ebenfalls auf eine Beteiligung des Immunsystems bei dieser Erkrankung hin (5, 17, 6o, 8o, 89, 92).

REEVES fand sogar Hinweise dafür, daß die cutane Überempfindlichkeit beim Meerschweinchen durch spätere Einatmung von Beryllium überbrückt werden kann und die Lungenreaktionen milder ausfielen als bei nicht cutan sensibilisierten Tieren. Die Deutung von REEVES, daß dieser Vorgang als Hyposensibilisierung zu erklären sei (66), wurde mehrfach in Frage gestellt.

Zu klären blieb noch die Frage, wie es zu der langen Latenzzeit bis zum Ausbruch der Erkrankung kommt, bzw. welcher Umstand zur Auslösung beiträgt.

1973 entwickelten CLARY und STOCKINGER ein Modell der Berylliosеauslösung, welches den von STERNER und EISENBUD vorgeschlagenen Pathomechanismus ergänzte (11, 79).

Schema 1:




## 6.2. Diagnose und Differentialdiagnose

Es waren nun Deutungen der Krankheitsvorgänge vorhanden, die Ansätze zur Klärung und zur Verbesserung der Diagnostik der Erkrankung lieferten.

Die Abgrenzung von der Sarkoidose, der Silikose, der miliaren Tuberkulose und anderen Erkrankungen mit ähnlichen röntgenologisch deutbaren Lungenveränderungen (24, 32, 44, 75, 82) ist arbeitsmedizinisch wichtig und von gutachterlicher Bedeutung (55). Es wurden klinische und epidemiologische Kriterien zur Diagnosestellung aufgestellt (82).

- Diffuse Verschattung im Röntgenbild mit und ohne Symptome
- Zeichen einer respiratorischen Insuffizienz zunächst durch Reduktion von Lungenvolumen oder Diffusionskapazität, später durch Obstruktion charakterisiert, gemäß dem Ausmaß der Fibrosierung
- Eine interstitielle und granulomatöse Pneumonie, durch Lungenbiopsie gesichert
- Eine systematische Vergiftung
- Positiver Berylliumnachweis im Gewebe

Dazu kommt eine eindeutige Expositionsanamnese. Diese und mindestens zwei der oben genannten Kriterien werden für die Diagnosestellung als notwendig erachtet, wobei große Bedeutung der Berylliumexposition selbst zukommt. Möglichst ist der genaue Expositionsverlauf über längere Zeit festzuhalten.

Ursprünglich war der Curtis-Hauttest als Diagnostikum vorgeschlagen worden (14, 15, 57, 91). Neben falschen negativen Resultaten kam es zur Exazerbation von Berylliose nach dem Test, woraufhin diese Methode nicht mehr empfohlen wurde (97, 1o6).

Die Röntgenbilder der Berylliose sind nicht spezifisch, so daß die Aufnahmen eine sichere Diagnose nicht erlauben. Außerdem liegen auffällige Befunde erst vor, wenn bereits eine deutliche Gewebsreaktion stattgefunden hat.

Quantitative Berylliumbestimmungen im Lungengewebe brachten

ebensowenig diagnostische Sicherheit, wie SCHEPPES nachgewiesen hat (75). Ferner ist die Gewebeentnahme von 5 g (36) Lungengewebe oder von Hiluslymphknoten ein Eingriff, der am Lebenden einer strengen Indikationsstellung bedarf.

Diese diagnostische Unsicherheit wurde 1966 von SCHÜRMANN unterstrichen, der über zwei Todesfälle von Berylliumarbeitern 1958 und 1959 in Hessen berichtet. Zu Lebzeiten wurde im ersten Fall eine entschädigungspflichtige Berufserkrankung anerkannt und im zweiten abgelehnt. Post mortem mußte erkannt werden, daß genau umgekehrt hätte entschieden werden müssen (77).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß weder röntgenologische Methoden, Lungenfunktionstests, histologische, serochemische, bisher übliche immunologische Untersuchungen, Berylliumgewebsanalysen, noch Bestimmung von Beryllium in Blut, Urin und Faeces allein die Diagnosestellung erlauben. Es muß eine mosaikartige Zusammenstellung der klinischen Befunde und Tests die Verdachtdiagnose stützen oder ausräumen.

## 6.3. Immunologische Methoden

Nachdem eine von Beryllium und seinen Verbindungen ausgelöste Immunität vom verzögerten Typ vorliegt, muß die sicherste Aussage über eine "positive" Immunitätslage gegenüber Beryllium durch die Untersuchung der zellulären Immunitätsmechanismen, insbesondere der T-Lymphozyten, erreicht werden. Die Wiederholbarkeit (69) dieser Tests, die im Gegensatz zu Hautsensibilisierungstests kein Risiko besitzen, dürfte, wenn eine vereinfachte Handhabung der T-Lymphozytentests machbar ist, ihren Einsatz als Screening-Test ermöglichen (105).

Entsprechend dem spätallergischen Typ ist die Treffsicherheit

eines Patch-Hauttestes nicht sehr groß und, wie oben erwähnt, bei Bestehen einer Lungenberylliose wegen der Gefahr einer Exazerbation des Lungenbefundes kontraindiziert.

Bei den zellulären Immunitätsprüfungen werden von den zu untersuchenden Individuen Lymphozyten in vitro kultiviert und ihre Immunkompetenz zur Durchführung Antigen-spezifischer Versuche ausgenutzt.

### 6.3.1. Der Makrophagen-Migrations-Hemmtest

Eine solche Untersuchungsmethode stellt der Makrophagen-Migrations-Hemmtest dar. Von RICH und LEWIS 1928 erstmals festgestellt, wird bei diesem Vorgang die natürliche Neigung von Makrophagen (häufig werden Peritoneal-Makrophagen von Meerschweinchen eingesetzt) auf einen Antigenreiz hin aus einer Kapillare auszuwandern, gehemmt (49). Diese Hemmung der Makrophagen-Migration ist, wie spätere Forschungen zeigten, auf einen Faktor zurückzuführen, welcher von Lymphozyten des zuvor sensibilisierten Organismus hochspezifisch auf erneuten Kontakt mit dem Antigen hin produziert wird, d.h. der Faktor wird nur gebildet, wenn dasselbe Antigen, welches zuvor für die Sensibilisierung verantwortlich war, wieder verwendet wird. Für die Produktion sind die für die zellulären Immunantwort zuständigen T-Lymphozyten ausschlaggebend. Der Faktor wird Makrophagen-Migration-Inhibitions-Faktor, "MIF", genannt.

Diese Tests wurden erfolgreich bei Versuchstieren und Menschen mit Berylliose eingesetzt (39, 46, 68).

### 6.3.2. Der Lymphozytentransformationstest

Das Prinzip besteht darin, die für die zelluläre Immunantwort verantwortlichen T-Lymphozyten in einer bei 37° C inkubierten Kultur zur

Zellteilung anzuregen. Dies kann mit sogenannten unspezifischen Stimulantien wie z.B. Phytohaemaglutinin (PHA), einem Extrakt aus der roten Gartenbohne, phaseolus vulgaris, erfolgen. PHA-Zugabe zur Kultur führt bei einem Großteil der T-Lymphozyten, welche die Fähigkeit haben, sich zu teilen, zur Vermehrung und zur Transformation in sogenannte lymphoblastenartige Zellen. Dies sind große Zellen mit basophilem Zytoplasma und einem Durchmesser von bis zu mehr als 16 µm.

Lymphozyten von auf ein bestimmtes Antigen sensibilisierten Individuen, lassen sich in der Lymphozytenkultur durch erneuten Kontakt mit dem Antigen aktivieren und zu obengenannter Reaktion stimulieren. Dieser Test ist spezifisch und gelingt nur mit dem entsprechenden Antigen. Vergleicht man die Anzahl der transformierten Lymphoblasten mit denen aus einer Kultur ohne Antigenzusatz, so läßt sich bei deutlicher Reaktion beweisen (88), daß der betreffende Organismus gegen das zu untersuchende Antigen sensibilisiert ist (1, 21, 27, 37, 38, 41, 52, 74).

### 6.3.2.1. Methodik des LTT und seiner Auswertung

Das obengenannte Prinzip des LTT wird in verschiedenen Methoden zur Anwendung gebracht. Waren anfangs noch die Lymphozyten isoliert worden (1, 27, 52), führte man später auch Vollblutmethoden ein, die schließlich zur einfacheren Handhabung u.a. von HEITMANN speziell zum Allergisierungsnachweis als Mikrovollblutmethode vereinfacht worden sind (37, 38, 100). Aus immunologischer Sicht entspricht dies ohnehin eher den Bedingungen in vivo, da so ein Zusammenwirken aller immunkompetenten Zellen möglich ist (49).

Das Blut wird in geeignetem Nährmedium, welches auch tiefgefroren aufbewahrt werden kann (38), im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach ca. 2 bis 3 Tagen erreicht die unspezifische Blastenbildung mit

PHA und nach 5 Tagen die antigene Blastenbildung einen Höhepunkt (37, 38, 41). Zu diesem Zeitpunkt sind die meisten polymorphkernigen Leukozyten zugrunde gegangen und es herrschen die lymphoiden Zellen vor. Ferner findet man noch die Monozyten und vereinzelte eosinophile Granulozyten. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die "Ernte" der Kultur und die Auswertung der Kulturergebnisse.

Es können Ausstriche angefertigt werden und die einzelnen Blasten nach Art des Differentialblutbildes unter dem Lichtmikroskop gezählt werden. Dabei wird die 1 ooo-fache Vergrößerung bei Ölimmersion gewählt.

Die Objektivierbarkeit bei dieser Methode ist bedingt, jedoch liegt der Vorteil in der Einfachheit des Verfahrens. Auch die phasenkontrastmikroskopische Auswertung wird beschrieben (62).

- Die Audioradiographie macht die $^{3}$H-Thymidin-markierten Zellen schwärzungsabhängig auf einem Film sichtbar. Die erforderliche Technik ist relativ nachweisintensiv (52).

- Die Scintillationszählung ist eine der in größeren Labors am häufigsten angewandten Methoden. Den Zellkulturen wird in der Nährlösung zur Nukleinsäuren- und Proteinsynthese $^{3}$H-markiertes Thymidin angeboten. Das Verhältnis der Aktivität der Gesamtkultur zur Aktivität der zellulären Elemente gibt deren DNS-, RNS- und Proteinsyntheserate an. Die Qualität der Ergebnisse ist stark von der Kulturdauer und der Expositionsdauer mit der $^{3}$H-markierten Aminosäure abhängig, da Beeinträchtigungen durch Strahlenschäden auftreten können. Es ist nicht sicher, ob die Thymidin-Einbaurate die reale Zellaktivität darstellt (52), sie kann daher nur als relatives Maß bei genormten Versuchsbedingungen gewertet werden.

Die Methodik des LTT hat sich in den letzten Jahren zunehmend bewährt. So finden sich in der neueren Literatur manigfaltige Anwendungen: Erfassung und Standardisierung von wasserunlöslichen Antige-

nen (25), gefrierkonservierten Lymphozyten (26), Masern-, Herpes simplex-, Mumps-, Rötelnantigen (42, 43, 98), zur Diagnostik bei Colon- und Rektumkarzinom (58), bei Meningitis mit Lymphozyten aus dem Liquor (61), bei der Taubenzüchterlunge (85), aber auch bei der Cobalt-Dermatitis (93), bei Nickelallergie (83, 94). Darüberhinaus findet der LTT Anwendung bei intrazerebraler Zinkimplantation (51), aber auch zur Einschätzung der Abwehrlage nach Unfallverletzungen (71).

Bei Berylliosexponierten und -kranken wurde der LTT u.a. von VAN GANSE, DEODHAR und von HANIFIN et. al., sowie von BAUER (3) durchgeführt.
Es konnte ein deutliches Verhältnis zwischen der Stimulationsrate gegenüber Kontrollgruppen aufgezeigt und geklärt werden, daß die aktivierten Lymphozyten an der zellulären Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ beteiligt sind (17, 89).

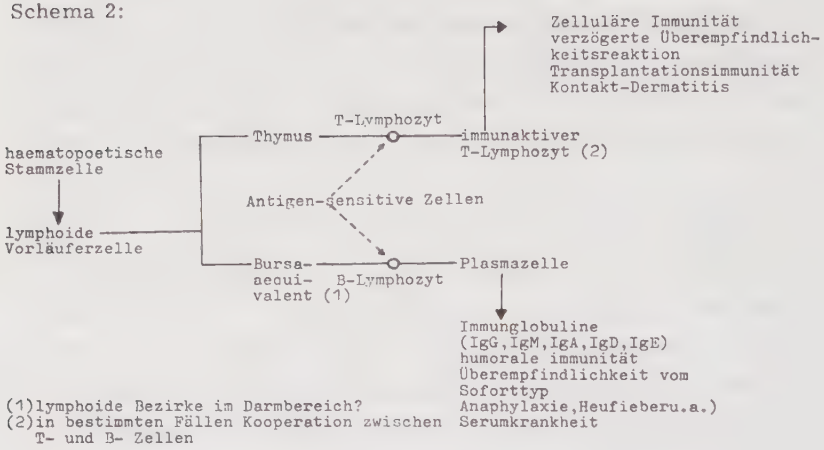
Im Tierversuch konnte mit Hilfe des LTT ebenfalls die verzögerte Überempfindlichkeit auf Beryllium nachgewiesen werden (2, 78, 101). ZELLER konnte an Ratten und BANDTEL bei Meerschweinchen nach $BeSO_4$-Aerosolinhalation ein Stimulationsmaximum bei 0,1 µg/5 ml Kulturmedium beobachten. Geringere und höhere Konzentrationen hatten einen geringeren Stimulationsreiz. Letzteres könnte mit einer zelltoxischen Komponente erklärt werden.

### 6.3.2.2. Die Stellung der Lymphozyten im Immunsystem

Unter den im Blut zirkulierenden lymphozytären Zellen werden im wesentlichen drei Zelltypen unterschieden: die Vorläufer der immunkompenten Zellen, kleine lymphozytenartige Zellen mit dunklerem Kern, die sich, vom Knochenmark kommend, auf dem Weg zum Ort ihrer weiteren Differenzierung in die lymphatischen Organe befinden. Sodann Zellen, die in den lymphatischen Organen u.a. aus diesen Vor-

läufern gebildet wurden: die sogenannten T- und B-Lymphozyten.

Schema 2:




Aus BRANDIS (8)

Wie in Schema (2) gezeigt, ist dabei die Reaktion auf einen antigenen Reiz sozusagen arbeitsteilig zwischen T- und B-Lymphozyten organisiert, wobei sich die Funktion der T-Zell-Population auf die zelluläre Immunität, die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion, die Transplantationsimmunität und die Kontaktdermatitis erstreckt. Die B-Zell-Population ist u.a. für die Immunglobulinproduktion (IgG. IgA, IgM, IgD, IgE), die humorale Immunität verantwortlich. Sie ist bei der Überempfindlichkeit vom Soforttyp (Anaphylaxie, Heufieber etc.) und der Serumkrankheit beteiligt. Durch zahlreiche Rückkopplungsvorgänge und hormonelle Einflüße sind die Immunitätsvorgänge sehr komplex.

Der wesentliche Effekt der Lymphozytenaktivierung auf den zellulär fixierten antigenen Reiz ist die Bildung sogenannter Memory-Cells, das sind Lymphozyten, welche als kleine, langlebige Transportform

die spezifische "Information", d.h. die Reagibilität auf das entsprechende Antigen bewahren, um für den Fall eines erneuten Kontaktes mit eben nur diesem Antigen wieder, wie oben beschrieben, reagieren zu können, bzw. in den lymphatischen Organen dafür zu sorgen, daß diese Reaktion ausgelöst wird (1o, 49). Hierbei wird verständlich: Eine der wichtigsten Aufgaben der Lymphozyten ist es, "selbst und nicht selbst" in einem Organismus zu unterscheiden. Die von BURNETT vertretene Klon-Selektions-Theorie schreibt die Aufgabe, die lymphozytären Vorstufen zu Immunozyten zu spezialisieren und dabei potentiell autoaggressive Zellen auszusondern, dem Thymus für die daher sogenannten T-Lymphozyten und den lymphoiden Bezirken im Darmbereich für die sogenannten B-Lymohozyten zu. Dies erklärt auch die beobachtete "Insuffizienz" der lymphatischen Organe bei der Lymphozytenproduktion: 9o% der dort gebildeten Lymphozyten gehen unter, 1o% werden in die Blutbahn abgegeben. Weitere Folgerungen zeigen, daß u.U. eine Memoryzelle genügt, um mit dem sogenannten Zellklon (identische Nachkommen einer Zelle) eine riesige Population spezifisch reagierender Zellen zu schaffen.

Ferner erklärt dies auch die Stimulationsergebnisse mit Blut lymphozytenallergisierter Spender, in dem sich lediglich ein Teil (5-5o%) der vorhandenen Zellen transformiert. Es ist ferner der spezielle Fall vorstellbar, daß bei einer Blutabnahme keine der gegen das betreffende Antigen spezialisierten Zellen - obwohl im Organismus vorhanden - mit erfaßt wird. Ein negatives Stimulationsergebnis ist in diesem Falle kein Beweis gegen einen vorher stattgehabten Antigenkontakt. Zumeist wird jedoch die"Erinnerung" an ein Antigen polyklonal bewahrt werden, d.h. Memory-Zellen verschiedener Abstammung, jedoch alle mit einem Unterschied an Ausmaß und Qualität der Spezifität gegenüber dem betreffenden Antigen wirken bei der Immunreaktion mit. In dieser, der Realität am ehesten entsprechenden Situation, ist die Wahrscheinlichkeit ungleich größer, einige kompetente Zellen bei der Blutabnahme zu erhalten, als im oben genannten Sonderfall (8, 1o, 52).

6.3.2.3. Der aktivierte Lymphozyt

In einer mit dem unspezifischen Stimulans PHA versetzten Vollblutkultur sieht man nach 24 Stunden, daß die kleinen und mittelgroßen Lymphozyten die vorherrschende kernhaltige Zellgruppe geworden sind. Die Granulozyten, bis auf die Eosinophilen, zeigen Zeichen der Zytolyse und verschwinden bald ganz. Es macht sich bei den Lymphozyten, die bis dahin einen dunklen Kern mit allenfalls einem geringen Zytoplasmasaum aufwiesen, eine deutliche Zellvergrößerung mit Auflockerung des Zellkerns, Sichtbarwerden von einem oder mehreren Nukleoli und zunehmender Basophilie des Zytoplasmas bemerkbar (1, 52).

Nach 48 Stunden gibt es von den anderen weißen Blutzellen allenfalls noch die eosinophile Granulozyten. Die vorhandenen Monozyten haben sich zu Makrophagen umgewandelt. Die Lymphozyten haben sich nun bereits deutlich zu blastenartigen Zellen von einer Größe von z.T. 12 - 3o um Durchmesser entwickelt. Es besteht ein hohes Kern/Zytoplasmaverhältnis, eine starke Basophilie des vakuolenreichen Zytoplasmas, mit z.T. einer halbmondförmigen Aufhellung in Kernnähe. Man sieht eine stark unregelmäßige Zellbegrenzung, die auf eine starke Bewegungsaktivität der Zelle hindeutet. Es fallen etliche prominente Nukleoli auf. Insgesamt werden jetzt innerhalb der blastenartigen Zellen unterschieden:

- Zellen mit sehr hohem Kern/Zytoplasmaverhältnis, starker Zytoplasmabasophilie mit einer blassen, gelblichen Aufhellungszone um den Kern.
- Den häufigsten Zelltyp mit mittlerem Kern/Zytoplasmaverhältnis und randständigem, runden bis ovalen Kern mit mehreren Nukleoli, oder einem Makronukleolus; das basophile Zytoplasma zeigt eine halbmondförmige Aufhellung in Kernnähe.
- Sehr große Zellen mit blassem Zytoplasma und mittlerem Kern/Zytoplasmaverhältnis.

Nach 72 Stunden überwiegen die großen Zellen mit unregelmäßiger Oberfläche und starker Vakuolisierung.

Es sind bereits nach 48 - 72 Stunden viele Mitosen sichtbar. In den weiteren Kulturtagen sieht man Zellhaufen und rosettenähnliche Verbände. Die transformierten Zellen haben das Bestreben, sich an ein Substrat anzuheften. Es werden jedoch auch über die ganze Zeit hinweg noch kleine, unveränderte Lymphozyten gefunden.

Elektronenmikroskopisch findet man im Zytoplasma einen hochentwickelten Golgiapparat, eine große Anzahl von Ribosomen, einzeln oder rosettenförmig angeordnet und vermehrt Mitochondrien. Der Golgiapparat enthält hohe Konzentrationen an Nukleosid-Diphosphatase und Thyraminpyrophosphatase. Es werden einige Lysosomen beschrieben. Es ist relativ wenig endoplasmatisches Rektikulum vorhanden. Man sieht weiter verstärkte Anzeichen für Mikropinozytose.

Im Kern ist der größte Teil des Heterochromatin durch Euchromatin ersetzt und es finden sich große, aktive Nukleoli.

Durch $^{3}$H-Thymidin-Markierung läßt sich eine hohe DNS-Produktion und hohe RNS-Synthese nachweisen. Letzteres erklärt die starke Basophilie des Zytoplasmas.

Der Nachweis einer Glucose-6-Phosphat-Succinat- und Lactatdehydrogenase-Aktivität spricht für eine starke Glycolyse (1, 41, 52).

# III. VERSUCHSPLANUNG UND DURCHFÜHRUNG

## 1. Fragestellung des Versuchs

Das Transformationsverhalten von Rattenlymphozyten im Lymphozytentransformationstest (LTT) nach Berylliumlangzeitexposition der Tiere gegenüber niedriger Berylliumsalzkonzentration (4 $\mu g/m^3$) im Vergleich zum Transformationsverhalten von Lymphozyten nicht exponierter Tiere soll untersucht werden. Berylliumsalze sollen dabei - ähnlich der Exponierung in der Arbeitswelt - der Atemluft beigegeben werden, und die Einflußgrößen auf den Versuch erfaßt werden.

## 2. Versuchsplanung

Die Aufgaben der Versuchsplanung bestehen neben einem geeigneten Aufbau darin, Methoden zur Ausschaltung von Faktoren zu finden, die eine Aussage über das Transformationsverhalten von Rattenlymphozyten störend beeinflussen könnten.

Nach einer Eingewöhnungszeit der Ratten an ihre neue Umgebung erfolgt die erste Blutabnahme zur Gewinnung eines Basiswertes. Damit werden Fehler, die durch den Ortswechsel und den Eingewöhnungsstress der Tiere entstehen könnten, vermieden. Der Basiswert dient zum Vergleich mit später erzielten Kulturergebnissen nach Berylliumexposition der Tiere. Die Verwendung ein und derselben Tiere dient der grundsätzlichen Vermeidung von Unterschieden des Immunsystems, sowie hormoneller Faktoren verschiedener Tiere.

## 2.1. Übersicht

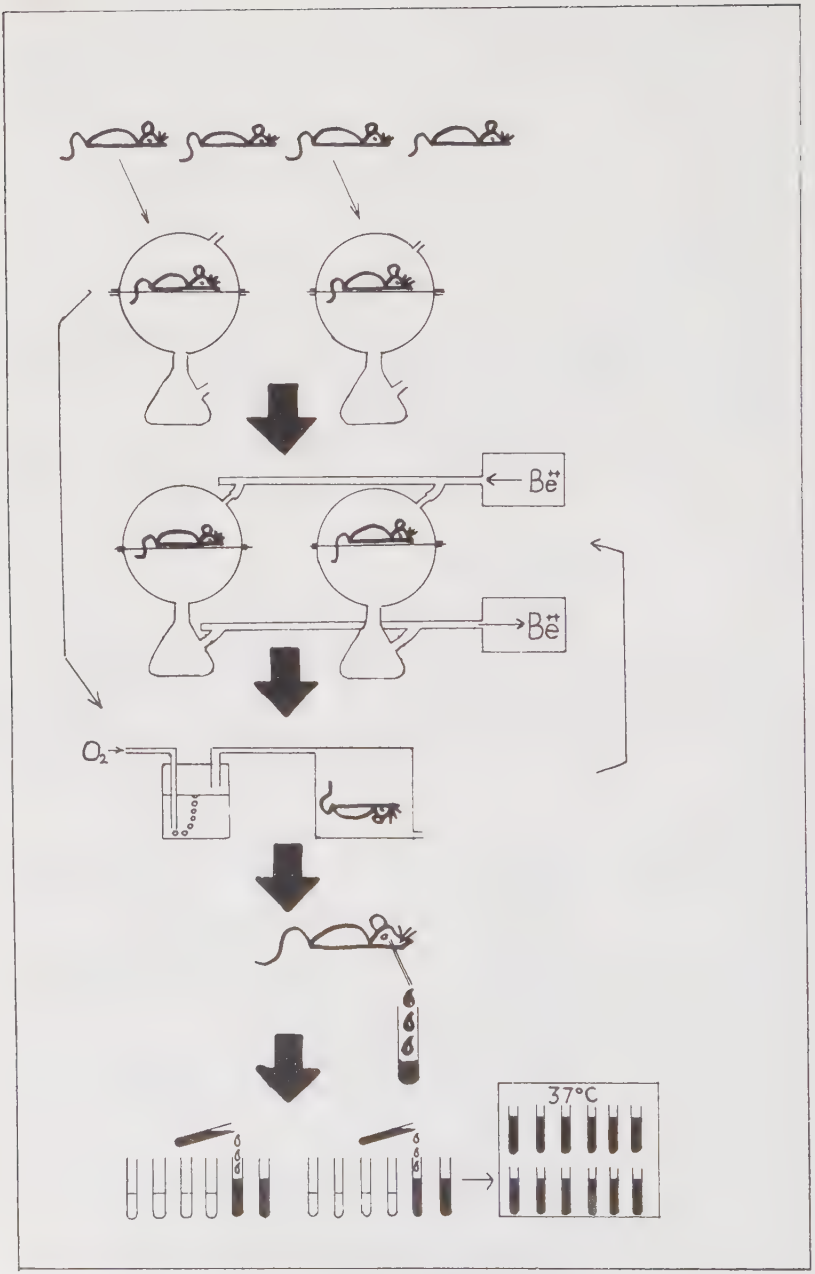
Der Versuch gliedert sich prinzipiell in vier aufeinanderfolgende Teilabschnitte:

- Exposition
- Inkubation
- Datengewinnung
- Auswertung

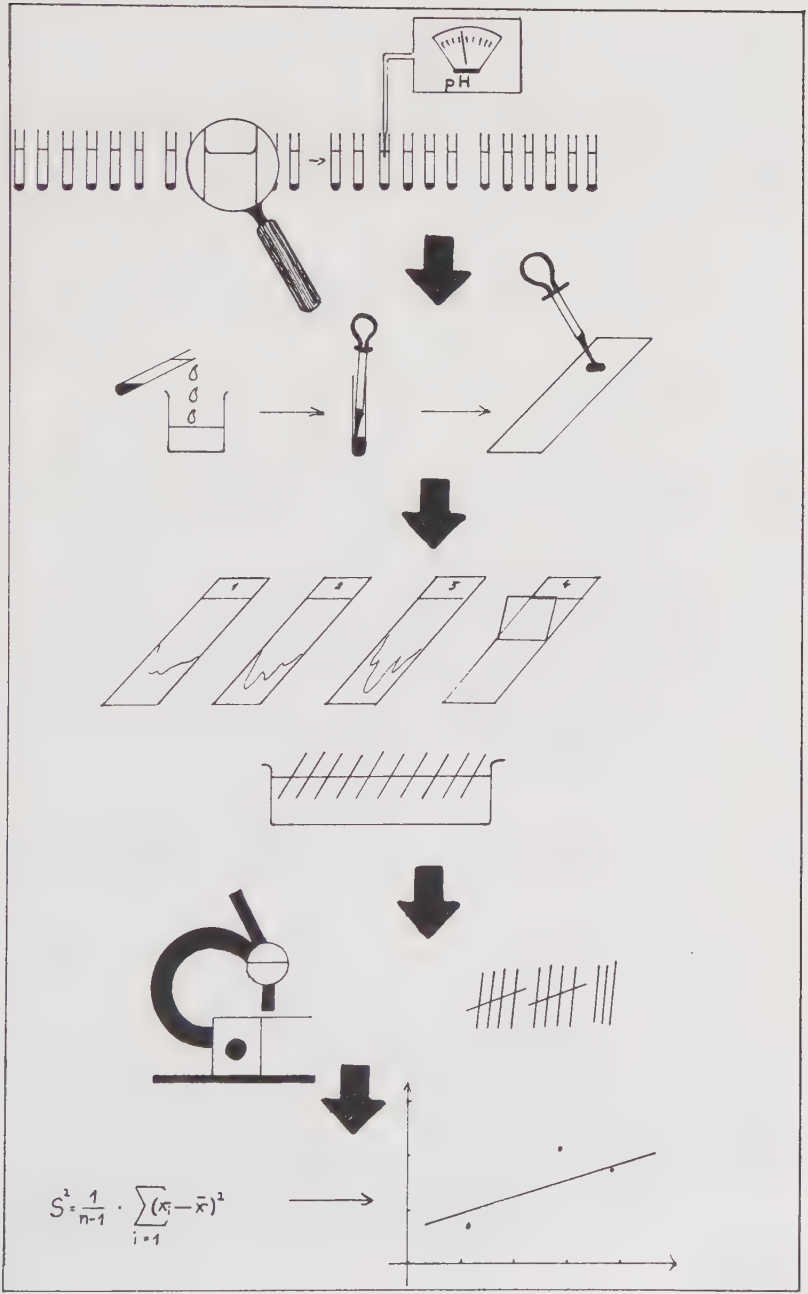
Jeder dieser Teilabschnitte erfordert eine weitere Untergliederung in Aufgaben und Teilschritte. Im Einzelnen sind dies:

- Exposition:
  - Auswahl der Versuchstiere
  - Gewöhnung der Versuchstiere an die neue Umgebung, daran anschließend LTT zur Festlegung des ursprünglichen Transformationsverhaltens
  - Exposition der Tiere für eine Dauer von 3o und 72 Tagen im Arbeitsrhythmus (8 Std. Exposition / 16 Std. Pause) bei einer Konzentration von 4 µg $Be^{++}/m^3$ in der Atemluft (doppelter ehemaliger MAK-Bereich), nachfolgend LTT zur Feststellung eventueller Änderungen im Transformationsverhalten.
- Inkubation:
  - Narkose der Tiere zur stressarmen Blutgewinnung
  - Blutabnahme
  - Lymphozytentransformationstest (LTT).
- Datengewinnung:
  - Makroskopische und chemische Beurteilung der Kulturen
  - "Ernten" der Kulturen
  - Anfertigen von gefärbten und fixierten Ausstrichen.
- Auswertung:
  - Auszählung der Ausstriche
  - Rechnerische und tabellarische Zusammenstellung zum Vergleich der Ergebnisse
  - Statistische Untersuchung über die Aussagekraft der Ergebnisse

Schema 3



Fortsetzung von Schema3



## 3. Durchführung des Versuchs

In der Reihenfolge der obengenannten vier Versuchsabschnitte und ihrer Teilschritte wurden vom Untersucher folgende Details festgelegt und durchgeführt:

### 3.1. Exposition

#### 3.1.1. Auswahl der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 12 gerade erwachsene 18o - 2oo g schwere Albino-Wistar-Ratten ausgesucht. 3 dieser Tiere waren weiblich. Die Tiere hatten einen gemeinsamen Stammbaum und waren unter gleichen Bedingungen keimarm aufgezogen worden. Neben technischen Gründen, die sich aus der Handhabung und Größe der Ratten ergeben, waren vor allem die noch nicht sehr zahlreichen vergleichbaren Versuche anderer Autoren und deren widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich des Stimulationserfolges bei dieser Tierspezies nach Berylliumexposition ausschlaggebend (52, 1o1).

#### 3.1.2. Gewöhnung der Versuchstiere an ihre neue Umgebung

##### 3.1.2.1. Unterhaltung

Das Käfigsystem wurde in einem Raum aufgebaut, der durchweg zwischen $18^{o}$ und $2o^{o}$ C temperiert war. Durch Ein- und Ausschalten des Lichtes zu gegebener Zeit wurde ein Tag/Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Störende Lärmquellen und Publikumsverkehr waren nicht vorhanden. Auf eine akustische Kulisse von Radiomusik, wie sie in verschiedenen Tierhaltungen der Industrie eingesetzt wird, wurde verzichtet.(22).

Die Tiere wurden täglich abends getränkt und gefüttert. Es wurden stets alle Tiere mit immer derselben Menge desselben Normfutters versehen. Einmal wöchentlich wurden die Käfige gemistet und gesäubert. Das Käfigsystem war so beschaffen, daß die Tiere, ohne Belästigungen zu erdulden, an Ort und Stelle bleiben konnten. Bei allen Manipulationen, die sich aus dem Versuchsablauf ergaben, wurde durch Kennzeichnung der Käfige und Markierung der betreffenden Tiere mit Pikrinsäure eine Vertauschung ausgeschlossen.

3.1.2.2. Das Käfigsystem

Die Tiere in Einzelkäfigen zu halten, erschien zwar aufwendig, aber auch notwendig. Es zeigten Versuche von ZELLER (101), daß Tiere, die in einem Gemeinschaftskäfig gehalten werden, sich in einer Ecke des Käfigs versammeln, und so an einer Stelle des Käfigs ein Lokalmilieu schaffen, in dem eine zuverlässige und gleichmäßige Konzentration von Beryllium nur unter Schwierigkeiten aufrechterhalten werden konnte. Des weiteren müssen Schwangerschaften bei den weiblichen Tieren, Brunft-, Futter- und Rangkämpfe etc. vermieden werden.

Da in Anbetracht der Toxizität von Beryllium ein geschlossenes System geboten war, welches möglichst gefahrlos Sauberhaltung, Gasaustausch und Fütterung bei einer größeren Zahl von Tieren erlaubte, entschloß sich der Untersucher Einzelstoffwechselkäfige der Firma Kavalier/Tschechoslowakei zu verwenden und diese, zur weiteren Sicherheit, im Saugbetrieb zu unterhalten.

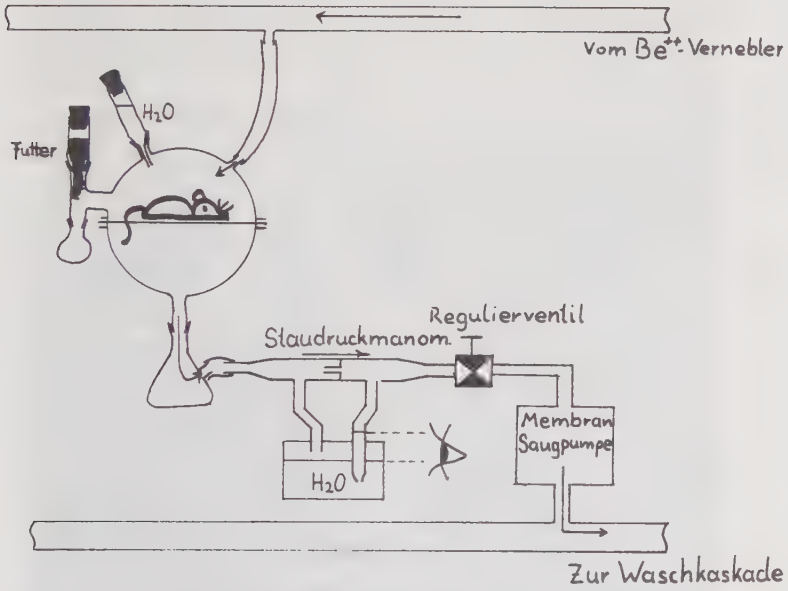
Die Käfige waren am Zuluft- und am Abluftstutzen jeweils an ein gemeinsames Schlauchsystem angeschlossen, welches sowohl am Ein- als auch am Ausgang in einen Polyäthylenschlauch mit einem Lumen von 4 cm Durchmesser mündete. Nach gegebener Zeit konnte ein Ultraschallvernebler der Firma Heyer, Typ USE 69 am Eingang vorgeschaltet werden. Der Ausgang mündete in eine Kaskade von Wasser-

Abbildung 1

Stoffwechselkäfig

flaschen, welche die Aufgabe hatte, die Abluft von Berylliumresten zu befreien. Jeder Käfig besaß an seinem Ausgang eine Membranpumpe, ein Dosierventil und ein Staudruckmanometer.

Schema 4




Da die Pumpen eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz im Dauerbetrieb aufweisen mußten, wurden Dosierventile und Membranpumpen vom Untersucher aus dem Aquarienfachhandel bezogen und eigens für diesen Zweck von Druck- auf Saugbetrieb umgebaut.

Die Unterdruckdurchflußmanometer wurden vom Untersucher gemeinsam mit einem Techniker nach den vorliegenden Erfordernissen selbst entworfen und nach der Herstellung geeicht.
So konnten die Hauptforderungen, die neben der gesundheitlichen Sicherheit an die Belüftung des Systems gestellt werden mußten, nämlich

- gleiche Belüftung aller Käfige
- mindestens 2o l Luftdurchsatz pro Tier und Stunde und

- maximale Betriebssicherheit (Ausfall einer Pumpe - Gefahr für nur ein Tier)

verwirklicht und nach der Eichung des Manometers mit Hilfe eines Flowmeters auch eingehalten werden.

Abbildung 2

Staudruck-manometer

Der Luftdurchsatz wurde auf 80 l pro Tier und Stunde eingestellt.

Nach jeder Öffnung des Systems wurde das zur Dichtung verwendete Schliffett erneuert und die Dichtheit der Anlage durch Messung des Luftdurchflusses mittels Flowmeter am Ein- und Ausgang überprüft.

### 3.1.3. Berylliumexposition

Um den Tierversuch so verwertbar wie möglich zu gestalten, wurde bei der Exposition darauf geachtet, daß Bedingungen geschaffen wurden, wie sie größenordnungsmäßig in der Realität der Arbeitswelt diskutiert werden müssen. So wurde eine Konzentration von 4 $\mu g/m^3$ Beryllium in der Atemluft, dem doppelten ehemaligen MAK-Bereich entsprechend, angestrebt und diese über acht Stunden aufrecht erhalten.

Aus technischen Gründen wurde das Beryllium der Luft mit einem Ultraschallvernebler als Aerosol zugeführt. Der Vernebler erzielte eine mit Sicherheit lungengängige Teilchengröße von o,1 - 5 µm Durchmesser. Verwendet wurde eine Berylliumsulfatstammlösung mit einer Konzentration von 1oo mg $Be^{++}$/l. Bei einem Ausstoß des Verneblers von 62,5 ml/Std. und den obengenannten Werten von Berylliumkonzentration und Luftdurchfluß mußten 5oo ml einer o,o23%igen Verdünnung in 8 Stunden vernebelt werden.

Mittels stichprobenartiger Messungen wurde die Käfigluft während den Verneblungsphasen mehrfach auf die Berylliumkonzentration kontrolliert.

## 3.2. Inkubation

### 3.2.1. Narkose

Die Narkose und die darauffolgende Blutabnahme bedeutet für die Tiere eine Unterbrechung ihres gewohnten Alltags, was naturgemäß durch die Entnahme aus den Käfigen und den Transport in das Laboratorium eine zusätzliche Stresskomponente mit sich brachte.

Vom Untersucher wurde diesem Faktum dadurch Rechnung getragen, daß

- die Tiere einzeln und auf dem schnellsten Wege ins Laboratorium

und wieder zurück gebracht wurden;

- die Narkose und alle zur Blutabnahme notwendigen Gerätschaften vorher bereitgelegt waren und
- durch die Narkose selbst, die gut steuerbar, in kürzest möglichem Exitationsstadium größtmögliche Schonung der Tiere gewährleisten mußte.

Es wurde daher ein Narkosesystem gewählt, welches bereits seit einiger Zeit bei der Firma THOMAE in Biberach mit Erfolg bei Ratten angewandt wird (22). Als Inhalationsnarkotikum diente der fluorierte Kohlenwasserstoff Ethrane ( 2-Chlor-1,1,2-trifluor-äthyl-(difluor - methyl) - äther), der mit reinem Sauerstoff verabreicht eine schnelle, ausreichend lange Narkose bei kürzestem Exitationsstadium gewährleistet.

Das betreffende Tier wurde in eine kleine Box (2o cm x 2o cm x 2o cm) gesetzt, die eine Zufluß- und eine Abflußöffnung besaß. Der Sauerstoff wurde in einer Waschflasche, die 4 cm hoch mit Enfluorane gefüllt war, mit dem Narkotikum angereichert und der Box zugeleitet.

Auf diese Weise konnte über die Höhe des Enfluorane-Spiegels und des Sauerstoff-Flow ein hinreichend genaues Narkosegemisch erzeugt werden.

Nach ca. 9o sec., bei individuellen Schwankungen, waren die Tiere hinreichend narkotisiert und bereit zur Blutabnahme.

Abbildung 3

Narkosesystem

3.2.2. Blutabnahme

Prinzipiell waren nur Methoden geeignet, die ohne großen Stress oder Verletzung der Tiere wiederholt durchführbar waren und die Gewinnung einer ausreichenden Menge Blutes gewährleisteten. Von den vier geläufigsten Methoden

- Schwanzvenenblutabnahme auch über Schwanzkürzung
- Herzpunktion
- Jugularispunktion
- Retroorbitale Augenvenenplexuspunktion

wählte der Untersucher die letztgenannte, da diese Methode bei den geringsten Risiken relativ schonend und auch wiederholt durchführbar

war. Über diese Methode lagen auch bereits langjährige, gute Erfahrungen der Firma THOMAE, Biberach, vor. Benötigt wurden dafür folgende Utensilien:

- Nichtheparinisierte Haematokritkapillaren der Firma HETTICH, Tuttlingen, Bestellnummer 573
- Glasschneidemesser mit geschliffener Klinge.

Mit der Schneide des Glasschneidemessers werden die Kapillaren in der Mitte vorsichtig angeritzt und daraufhin entzweigebrochen. Die Bruchstücke können unter der Bedingung weiterverwendet werden, daß sie bei Lupenvergrößerung eine rundum glatte Bruchfläche ohne Grat und Scharte haben. Diese Bruchfläche dient bei der Blutabnahme als Schneide der Kapillaren. Die geprüften Kapillaren werden vorher sterilisiert.

Das vollständig relaxierte Tier wird nun mit dem Hals über die Kante der Unterlage gelegt und mit den ersten drei Fingern der linken Hand ein dosierter, kopfseitiger Venenstau provoziert. Die rechte Hand führt nun unter Schonung des Bulbus die Schneide einer Kapillare in den medianen Augenwinkel des Tieres ein und leitet die Kapillare unter ruckartiger Drehbewegung im Uhrzeigersinn, den von der Anatomie bestimmten Winkel nach medial unten. Die Punktion des Augenvenenplexus ist an der schnellen Blutfüllung der Kapillare erkennbar. Die Kapillare wird losgelassen und die benötigte Menge Blut in ein dafür vorgesehenes Gefäß geleitet.

Nachdem die benötigte Tropfenzahl aufgefangen ist, wird der Venenstau aufgehoben, die Kapillare gezogen und durch Lidschluß die Blutstillung vorgenommen.

Vorversuch A:

Durch einen Vorversuch wurde mit Blut von normalem Haematokrit eine Quantifizierung der Tropfen bei den verwendeten Kapillaren vor-

genommen. Es ergab sich, daß 2o Tropfen einem Volumen von exakt 2 ml entsprachen.

Vorversuch B:

Durch einen weiteren Vorversuch, der freundlicherweise von der Firma THOMAE durchgeführt wurde, zeigte sich, daß obengenannte Methode der retrobulbären Augenvenenplexuspunktion als sterile Blutabnahme gelten kann (53).

### 3.2.3. Der Lymphozytentransformationstest (LTT)

Nach ZELLER stellt der LTT, durchgeführt mit der Mikrovollblutmethode von HEITMANN und SCHWARZACHER, einen auch für kleinere Laboratorien einfachen Test dar, der es erlaubt, Veränderungen bei einem grösseren Untersuchungsgut mit geringem Aufwand hinreichend genau zu erfassen (38, 1o1).
Die in dieser Arbeit aufgeführten Argumente für diese Methode sind:

- Unkomplizierte Handhabung
- Geringer Zeitaufwand
- Verringerung der Störanfälligkeit durch Reduzierung der Arbeitsgänge
- Durchführbarkeit einer großen Untersuchungszahl mit geringer Blutmenge und nicht zuletzt
- weitgehende Erhaltung des natürlichen Zellzusammenhangs der kultivierten Zellen.

Dies konnte in einem VORVERSUCH C bestätigt werden.

Das Problem, bzw. ein Nachteil der Methode, sind die durch die metabolische Aktivität der Erythrozyten bedingten Einflüsse auf Glucose-, Sauerstoff- und $CO_2$-Konzentration. Mittels genauen PH-Messungen,

Pufferung und exakt gesteuertem $CO_2$-Milieu im Brutschrank kann dieser Nachteil weitgehend kompensiert werden, so daß die Mikrovollblutmethode als Methode der Wahl für die gestellte Aufgabe bezeichnet werden kann.

Der LTT gliedert sich in folgende Teilschritte:

3.2.3.1. Ansetzen des Kulturmediums und Vorbereitung der Antigenkulturen sowie Vorbereitung der Stimulations- und Backgroundkontrolle

Liste der notwendigen Arbeitsgeräte:

- Eine Sterilbox
- Eine Pipette mit 5 ml Hub
- Eine o,5 ml Mikroliterpipette mit Spitzen
- Eine o,1 ml Mikroliterpipette mit Spitzen
- Ein heizbares Rührgerät
- Zwei Magnetrührfische
- Zwei Pinzetten
- Eine Rekordglasspritze mit Luerlockverschluß
- Zwei Satoriusmembranfilter mit eingelegtem Filterblättchen, locker verschraubt, von der Fa. SATORIUS, Göttingen
- Eine Glaspipette
- Zwei Kolbensägen
- Einen kleinen Bunsenbrenner mit dazugehörigem Gasanschluß
- Eine $CO_2$-Gasflasche mit Druckreduzierung sowie bakteriendichtem Gasfilter
- Dem Versuch entsprechende Anzahl von sterilisierbaren Reagenzglasständern, sowie eine entsprechende Anzahl von sterilverpackten Polystyrol-Reagenzröhrchen
- Ein thermostatisch gesteuerter Ofen, im 5o Gradbereich regelbar
- Ein pH-Meßgerät

- Ein thermostatisch gesteuerter Brutschrank
- Eine Gasflasche mit Gasgemisch von 64% $O_2$, 4,5% $CO_2$, 31,5% $N_2$ gefüllt mit dazugehörigem Reduzierventil und bakteriendichtem Gasfilter
- Eine Absaugvorrichtung mit Saugpumpe, Vorratsflasche und Saugschlauch
- Eine elektronisch drehzahlgesteuerte Zentrifuge
- Eine entsprechende Anzahl von Objektträgern
- Ein Ausstrichglas
- Eine Färbebank
- Eine entsprechende Anzahl von Objektträgerständern
- Ein Großfeldmikroskop mit Fotoaufsatz

Liste der notwendigen Materialien:

- 5 ooo Einheiten Liquemin
- 5 ml o,4% NaCl pro Injektione
- 3oo ml pyrogenfreies Aquatridest
- 5 ml Baktophytohaemaglutenin B, Difkolaboratories, Detroit
- 1o ml 1% TC-Bicarbonat, Difko
- 5oo ml Nährmedium RPM 1164o, (Microbiological Associates Bethesda, Maryland mit Phenolrotindikator) TC Fetal Calf Serum, dessicated, Difko
- 1o ml Methylenblaufärbelösung nach Wright, Aqua dest., reinen Alkohol, Sterilium, Sagrotan, Wischtücher, sterile Handschuhe
- $BeSO_4$-Stammlösung mit einer $Be^{++}$-Konzentration von 1oo mg $Be^{++}$/1

Vorgehensweise: Sicherstellung einer möglichst absoluten Keimfreiheit. Für die Kultur müssen folgende Arbeitsgeräte sterilisiert, sterilisiert beschafft oder mit sterilisierender Lösung abgewischt werden: Sterilbox, Teile der Seripette, Mikroliterpipetten, Magnetrühr-

fische, Pinzetten, Rekordglasspritze mit Luerlockverschluß, Satoriusmembranfilter, Pasteurpipetten, Kolbensägen, Kleinbunsenbrenner, Reagenzglasständer.

Herstellen der Kultur gemäß dem Kulturschema:

Tabelle 1

| Kultur | Stimulans |
|---|---|
| 1a, 1b | 1 : 5oo PHA |
| 2a, 2b | o,9% NaCl |
| 3a, 3b | o,o1 µg $Be^{++}$ / Kultur |
| 4a, 4b | o,1o µg $Be^{++}$ / Kultur |
| 5a, 5b | 1,oo ug $Be^{++}$ / Kultur |
| 6a, 6b | 1o,oo µg $Be^{++}$ / Kultur |

Gemäß dem Kulturschema werden pro Tier und Versuch 2 x 6 Kulturen angesetzt. (Pro Tier wird ein Ständer mit 12 Reagenzröhrchen bereitgestellt). Die Formel für den Bedarf an Volumen/Kulturmedium in Milliliter ergibt sich aus der Zahl der Tiere A, dem Kulturschema,den Einzelkulturvolumen, den Blutwaschkulturen, der PHA-Verdünnungskultur und den Antigenverdünnungskulturen:

$$x \text{ ml} = (12A + 2A + 1 + 3) \times 5$$

wobei x das gesuchte Volumen und A die Anzahl der Tiere darstellt. Daraus ergibt sich die Formel 2:

$$x \text{ ml} = (14A + 4) \times 5$$

Nach Auflösen des TC-Fetal Calf Serum in 1oo ml dreifach sterilisiertem , pyrogenfreiem Wasser, wird das Serum in einem thermostatisch gesteuerten Ofen bei $56^{\circ}$ Celsius 3o Minuten lang inaktiviert,

um etwa vorhandene, nicht cytophile Antikörper zu desaktivieren (8, 52). Währenddessen werden die anderen Materialien vorbereitet:

- Einlegen folgender Ampullen in Sterilium: Liquemin, NaCl, Aquatridest
- Auflösen folgender Präparate in pyrogenfreiem Aquatridest:
  5 ml Baktophytohaemaglutinin P,
  1o ml 1% Penicillin/Streptomycin,
  1o ml 1o% TC-Bicarbonat von Difko
- In der mit Sagrotan (2 - Phenylphenol, Chlorocresol, 2 - Benzyl - 4 Chlorphenollösung) ausgewischten Sterilbox wird ein in ein steriles Tuch eingeschlagenes, heizbares Magnetrührgerät aufgestellt und darauf das sterilisierte Vorratsgefäß der Seripette mit Rührfisch angebracht. Die vorbereitete $BeSO_4$-Stammlösung wird bereitgestellt. Es werden mehrere 2 ml Einmalspritzen mit Kanüle zur pH-Einstellung und -Messung bereitgelegt. Außerdem werden die sterilisierten Reagenzglasständer mit den mit Deckeln versehenen Polystyrolröhrchen bestückt und ebenfalls bereitgestellt.
- Ein sterilisierter Kleinbunsenbrenner wird in der Sterilbox aufgestellt.
- Das pH-Meter der Firma ESCHWEILER wird auf Betriebstemperatur gebracht und geeicht.

Nun wird das inzwischen inaktivierte Fetal Calf Serum nach Abflammen der Flaschenhälse im Vorratsgefäß mit 5oo ml Nährmedium vermischt und unter 1o minütigem Rühren 5 ooo Einheiten cresolfreies Heparin und 6 ml der Penicillin/Streptomycin - Lösung eingebracht (52).

Durch Regulierung der Heizung wird das Gemisch auf ca. $37^{o}$ C erwärmt.

Mit einer sterilen Einmalspritze werden kleine Proben entnommen und mit dem PH-Meter gemessen. Unter tropfenweiser Zugabe von Natriumbicarbonat bzw. Einleiten von durch ein Sterilfilter der Firma

HEYER gereinigtes $CO_2$-Gas wird ein PH von 7,3 eingestellt. Die Seripette wird auf das Vorratsgefäß aufgesetzt und nach drei bis vier Probefüllungen die bereitgestellten Röhrchen mit je 5 ml Kulturlösung beschickt.

Danach werden Bunsenbrenner, Seripette und Rührgerät aus der Sterilbox entfernt. Nun werden zwei Kulturröhrchen zur Blutwäsche, ein Röhrchen zur PHA-Verdünnung und drei Röhrchen zur Antigenverdünnung zur Seite gestellt.

Kulturgruppe 1

Stimulationskontrolle der Kulturen mit PHA

In ein Kulturröhrchen mit 5 ml Medium werden mit einer o,5 ml Mikropipette o,5 ml der PHA-Lösung pipettiert und mit einer o,1 ml Mikropipette o,1 ml davon nach gründlicher Durchmischung in alle Kulturröhrchen der Nr.1 eingefüllt.

Kulturgruppe 2

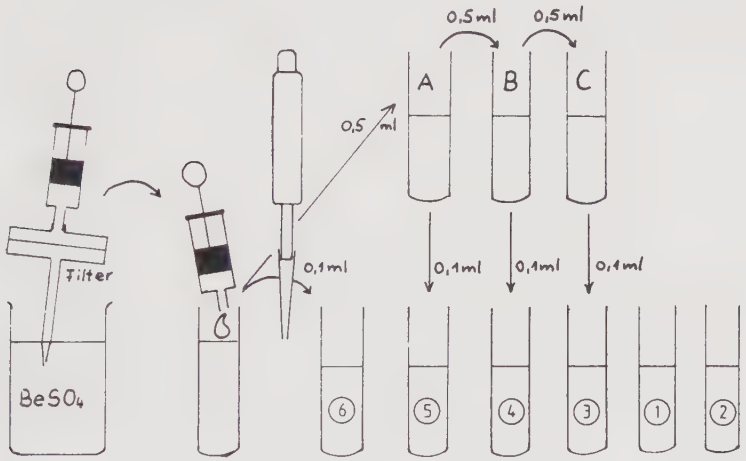
Herstellen der negativen Kontrollkulturen mit NaCl

Mit einer o,1 ml Mikropipette werden o,1 ml der sterilen o,9% Natriumchloridlösung in alle Kulturröhrchen Nr.2 pipettiert. Somit werden in allen Kulturröhrchen die Volumina gleichmäßig von 5,o ml auf 5,1 ml erhöht, was keine nennenswerten PH-Änderungen mit sich bringt.

Kulturgruppen 3 - 6

Anfertigen der Antigenverdünnungsreihe

Schema 5




Aus der Berylliumsulfatstammlösung, in der 1oo mg Beryllium pro Liter enthalten sind, werden mit Hilfe der Luerlockspritze bei aufgesetztem Satoriusmembranfilter einige Milliliter keimfrei abgezogen. Davon werden mit einer o,1 ml Mikropipette o,1 ml, d.h. 1o µg in alle Kulturröhrchen Nr.6 pipettiert.

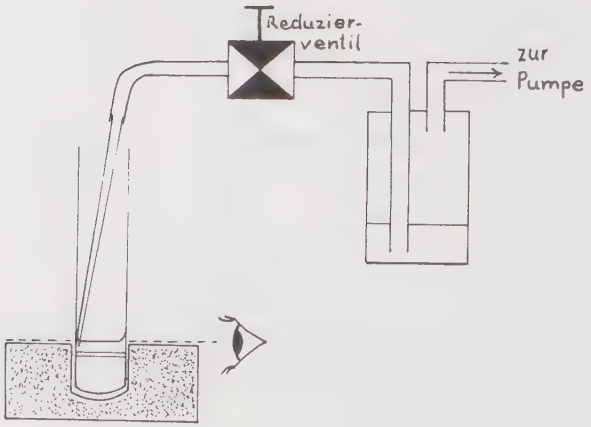
Mit einer o,5 ml Mikropipette wird mit drei vorbereiteten Kulturröhrchen A, B, C eine Verdünnungsreihe hergestellt:
Die o,5 ml werden in A eingefüllt und gut durchgemischt. Davon werden o,5 ml in B eingefüllt und davon wieder o,5 ml in C. Jeweils nach guter Durchmischung und Pipettenspitzenwechsel werden mit der o,1 Mikroliterpipette o,1 ml aus A in alle Kulturröhrchen Nr.5 (1 Mikrogramm Beryllium) abpipettiert, o,1 ml aus B in die Kultur-

röhrchen Nr.4 und aus C o,1 ml in die mit der Nr.3.

3.2.3.2. Menge und Verarbeitung des gewonnenen Blutes

Bei der Blutabnahme wurden von jedem Tier 1 Mal 2O Tropfen Venenblut in jeweils ein vorbereitetes Röhrchen mit 5,1 ml Nährlösung eingetropft, das Röhrchen verschlossen und zentrifugiert. Diese Zellwäsche sollte Interaktionen mit dem eigenen Serum der Tiere unterbinden (52). Dabei war die elektronisch regelbare Zentrifuge mit einem Drehzahlmesser auf 1 5oo upm geeicht. Nach etwa drei Minuten, sobald alle Zellen sedimentiert waren, wurde der Überstand sehr langsam und vorsichtig mit einer gedrosselten Saugvorrichtung abgesaugt. Als Saugspitze diente dabei eine sehr dünn ausgezogene Glaskapillare. Um diesen Waschvorgang unter immer gleichen Bedingungen und absolut erschütterungsfrei durchführen zu können, wurde in einem Plastikklotz eine genau ausgemessene Bohrung gestellt und der Saugvorgang abgebrochen, sobald der untere Meniskus den Rand der Bohrung erreichte.

Schema 6



So wurde bei jeder Blutabnahme ein immer gleiches Ausgangsvolumen reproduzierbar, wobei sich jeweils der korpuskuläre Anteil des Blutes entsprach.

Mit einer leichtgängigen Einmalspritze wurde das vorsichtig aufgeschüttelte Sediment aufgenommen und gleichmäßig in die 12, in einem Ständer bereitstehenden, Kulturröhrchen eingetropft. Diese wurden daraufhin einmal aufgeschüttelt und mit sterilen Stopfen lediglich lose bedeckt, so daß ein Gasaustausch mit dem Blutraummilieu stattfinden konnte.

Zellzahl

Nach LING ist in Kulturen gemischter Zellen die untere Zellzahlgrenze $1o^5$/ml. Die Obergrenze wird von der Qualität des Mediums bestimmt. Sie wird normalerweise in Vorversuchen bestimmt, wobei der limitierende Faktor die durch die Glycolyse entstehende pH-Verschiebung des Mediums in den sauren Bereich darstellt. Im allgemeinen ist eine Konzentration 1-2 x $1o^6$ Zellen/ml Kultur empfohlen, es sind aber auch bis zu 5-1o x $1o^6$/ml erreichbar (52). Diese Angaben decken sich ungefähr mit denen anderer Autoren (2, 38, 39, 41, 46, 1oo, 1o1).

Im vorliegenden Fall war die zugewinnende Blutmenge einmal durch die Ratte als Kleinsäugetier selbst und zum anderen durch das Konzept begrenzt, die Tiere nicht ausbluten zu lassen, sondern weiter zu beobachten. Daher mußte eine Obergrenze von 1 ml Blut, entsprechend 2o Tropfen bei der Blutabnahme festgelegt werden. Bei den zuvor ermittelten Leukozytenwerten der Tiere zwischen 5 und 9 x $1o^3$ Leukozyten/$mm^3$ wurde so eine Leukozytenzahl von ca. 1,25 x $1o^5$ Zellen/ml-Kulturmedium eingestellt, was an der unteren von LING angegebenen Grenze liegt (52).

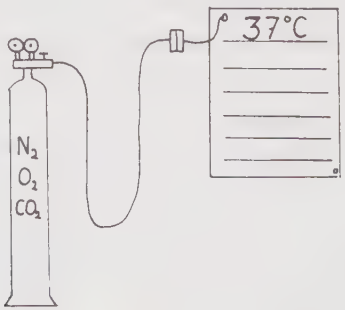
3.2.3.3. Inkubation

Mit der Beschickung der Kulturröhrchen mit Vollblut war der Teil des LTT gestartet worden, bei dem es in besonderem Maße auf hohe Sorgfalt ankam.

Sollten doch möglichst alle störenden äußeren Einflüsse, wie Temperaturschwankungen, Schwankungen der $O_2$- und $CO_2$-Atmosphäre, Licht, Infizierung mit Keimen, sowie mechanische Irritationen vermieden werden. Auch sollten die inneren Verhältnisse, pH-Wert, Stoffwechsel, Zellkonzentration, Kulturmedium konstant gehalten und die Abwesenheit von nicht erwünschten antigenwirksamen Substanzen bewirkt werden (52).

Der Brutschrank wurde vor Licht geschützt, indem er mit geeignetem Material abgedeckt wurde. In einem Vorversuch wurde mit 1o geeichten Thermometern geklärt, wo die Orte mit konstanter Temperatur zu finden waren und wo die beste Stelle für den Zufluß des Gasgemisches zu suchen war, welches zur Aufrechterhaltung einer konstanten $O_2$ / $CO_2$ / $N_2$ - Atmosphäre dienen sollte. Ebenso wurde der Gaszufluß ermittelt, welcher die Temperatur im Brutschrank nicht verminderte und doch eine konstante Atmosphäre aufzubauen im Stande war. Es wurde ein Gasgemisch von 64% $O_2$, 4,5% $CO_2$ und 31,5% $N_2$ verwendet, welches über einen Gasbakterienfilter der Firma HEYER gereinigt zugeführt wurde (52, 93, 1oo)

Schema 7



Die beschickten Kulturen wurden zur Vermeidung einer störenden Abkühlung sehr schnell in den zuvor mit Sterilium ausgewischten, ausgelüfteten und vorgeheizten Brutschrank gestellt und dort 5 mal 24 Stunden ohne jede mechanische Manipulation inkubiert.

## 3.3. Datengewinnung

### 3.3.1. Makroskopische und chemische Beurteilung der Kulturen

Nach 12o Stunden wurden die Kulturen durch Augenschein kontrolliert, um eventuell mißlungene Versuche mit Keimwachstum auszusortieren. Nicht zu beanstandende Kulturen zeigten ein rotes Erytrozytensediment, welches von einer hellen Schicht, der "Buffycoat" der Leukozyten bedeckt war. Darüber befand sich der klare Überstand des Kulturmediums, welcher ohne Zytolysezeichen (z.B. Haemoglobin geplatzter Erytrozyten) einen gelblichen Ton aufwies. Röhrchen um Röhrchen wurden dem Brutschrank entnommen und einer pH-Messung mit dem Gerät der Firma ESCHWEILER unterzogen. Hierbei zeigte sich bei wenigen Ausnahmen, daß durch den Stoffwechsel der Zellen der pH - Wert der Kulturen in den sauren (pH 6,9 - 7,2) Bereich abgefallen war.

### 3.3.2. "Ernten" der Kulturen

Ziel der "Ernte" war es, aus Zellsuspensionen Ausstriche anzufertigen, bei denen ein immer gleiches Verhältnis zwischen Blutzellen und Nährmedium vorherrschte, um mit einer gleichmäßigen Qualität den systematischen Fehler gering zu halten. Dies konnte am genauesten dadurch erreicht werden, daß der Überstand einer Kultur immer vorsichtig bis auf ca. 1 mm über den sedimentierten Zellen abgesaugt wurde. Dazu wurde die Saugvorrichtung, welche auch bei der Zell-

wäsche verwendet wurde, benutzt. Gleichzeitig war das Aufschütteln und wieder Zentrifugieren der Kulturen zu vermeiden. Die zu fordernde Homogenität der Suspension wurde durch vorsichtiges, aber dennoch gründliches Aufschütteln der Kulturen nach dem Absaugvorgang erreicht. Diese Methode hat gegenüber anderen den Vorzug, jegliche Verluste weißer Zellen zu umgehen. Erfahrungsgemäß war es sehr schwierig, nach Beendigung der Kultur durch Zentrifugation bei ca. 1 5oo upm in einer vertretbaren Zeit eine vollständige Sedimentation zu erreichen. Ein Zellverlust beim Abziehen des Überstandes wäre nahezu unvermeidbar gewesen.

### 3.3.3. Anfertigen der Ausstriche

Aus der frisch aufgeschüttelten Zellsuspension wurde mit einer Pasteurpipette je 1 Tropfen auf zwei mit reinem Alkohol gereinigten und getrockneten Objektträgern (z.B. $a_I/a_{II}$ bzw. $b_I/b_{II}$) gebracht und mit einem Deckglas ausgestrichen. Nach Lufttrocknung wurde mit Methylenblau - Eosinlösung nach WRIGHT eine panoptische Färbung vorgenommen. Damit wurden also von jeder Kultur zwei Ausstriche, bzw. von jeder Antigenkonzentration 1-6 jeweils vier Ausstriche, d.h. von jedem Tier und Versuch 24 Ausstriche angefertigt.

## 3.4. Auswertung

### 3.4.1. Auszählen der Ausstriche

#### 3.4.1.1. Technik

Zur mikroskopischen Beurteilung der Zellen wurde die 1 ooo fache Vergrößerung bei Ölimmersion gewählt (Leitz Ortoplan). Alle Ausstriche wurden nach Art des Differentialblutbildes ausgezählt. Nach

den Richtlinien für die Differenzierung von Blutbildern wurde ein Objektträger mäanderförmig unter dem Objektiv bewegt und 2oo weiße Zellen begutachtet. So wurden pro Tier von jeder Antigenkonzentration 8oo Zellen ausgezählt. Pro Objektträger wurde je eine normierte Strichliste geführt (18, 67).

Schema 8

| Tier Nr. | Ausstrich Nr. | Antigen: | pH: | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Lymphozyten | Transformierte | Eosino. | Neutro. | Baso. | Mono. |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |
| 17 | | | | | | |
| 18 | | | | | | |
| 19 | | | | | | |
| 20 | | | | | | |
| Summe | | | | | | |

### 3.4.1.2. Qualitative Beurteilung

Die morphologischen Kriterien zur Unterscheidung der Zellen als transformierte "Blasten" oder Lymphozyten wurde in einer Art Steckbrief zusammengefasst:

- Zellgröße über 14 µm
- Kerngröße über 7 µm
- großer, locker strukturierter Kern mit einem oder mehreren Nukleolen
- ausgeprägte Basophilie
- starke Vakuolisierung des Zytoplasmas

Eine Zelle mußte mindestens 3 dieser Kennzeichen aufweisen, um als Lymphoblast gewertet zu werden.

### 3.4.1.3. Quantitative Beurteilung

Zur zahlenmäßigen Erfassung der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil der Lymphoblasten an der Summe der lymphozytären Zellen angegeben. Die übrigen Leukozyten blieben dabei unberücksichtigt.

### 3.4.1.4. Kritik der qualitativen Auswertung durch das Mikroskop

Die Methode, die Ergebnisse eines LTT in der Art eines Differentialblutbildes als Ausstrichpräparat auf dem Mikroskop zu ermitteln, vereinigt die Vorteile einer in jedem Labor zur Routine gehörenden Methode mit dem des relativ geringen technischen Aufwandes. Der Vorgang der Auswertung ist wiederholbar und somit auch von erfahrenen Fachkräften überwachbar. In Zweifelsfällen sind die Ausstriche mit anderen vergleichbar und lassen sich zu diesem Zweck auch archivieren. Ebenso bietet sich eine Verlaufskontrolle durch den direkten Vergleich der Ausstriche von älteren Kulturen mit solchen neueren Datums

Tier Nr. 1 Versuch Nr. 1

| Kultur | Ausstrich | Zellzahl (lymphoide) | | pH | | transformiert | | Neutro | | Baso | | Eos | | Mono | | $\bar{x}$ in % transformierte aus | ges. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | | $a_I, a_{II}$ | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | $b_I, b_{II}$ | |
| 1 | $a_I, a_{II}$ | 200 | 200 | 7,14 | 7,14 | 118 | 111 | 0 | 3 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 57,25 | 55,75 |
| | $b_I, b_{II}$ | 200 | 200 | 7,19 | 7,19 | 126 | 91 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 54,25 | |
| 2 | $a_I, a_{II}$ | 200 | 200 | 7,19 | 7,19 | 20 | 28 | 2 | 0 | 0 | 0 | 6 | 10 | 1 | 3 | 12,00 | 18,44 |
| | $b_I, b_{II}$ | 200 | 200 | 7,13 | 7,13 | 47 | 52 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 5 | 0 | 1 | 24,88 | |
| 3 | $a_I, a_{II}$ | 200 | 200 | 7,12 | 7,12 | 30 | 19 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 4 | 0 | 0 | 12,25 | 13,37 |
| | $b_I, b_{II}$ | 200 | 200 | 7,22 | 7,22 | 26 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 14,50 | |
| 4 | $a_I, a_{II}$ | 200 | 200 | 7,12 | 7,12 | 17 | 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 7,25 | 6,62 |
| | $b_I, b_{II}$ | 200 | 200 | 7,19 | 7,19 | 9 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 6,00 | |
| 5 | $a_I, a_{II}$ | 200 | 200 | 7,20 | 7,20 | 11 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 2 | 6,75 | 6,75 |
| | $b_I, b_{II}$ | 200 | 200 | 7,20 | 7,20 | 9 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 5,00 | |
| 6 | $a_I, a_{II}$ | 200 | 200 | 7,16 | 7,16 | 13 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 6 | 0 | 0 | 7,25 | 8,50 |
| | $b_I, b_{II}$ | 200 | 200 | 7,10 | 7,10 | 16 | 22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 9 | 8 | 0 | 1 | 9,50 | |

Schema 9

an. Diese Methode liefert zudem mehr Informationen, als zur direkten Auswertung notwendig sind. Form, Färbung und Größe sämtlicher Zellen, sowie deren Zellverhältnisse sind direkt ablesbar. Es ist ein umfassender Eindruck über den Zustand der Kultur zum Zeitpunkt der "Ernte" zu gewinnen, also eine Kontrolle darüber, wie gut der Versuch, einen Vorgang des (lebenden) Immunsystems in vitro fortzusetzen, gelungen ist. Ein erster Einblick in das Stimulationsergebnis ist schnell zu gewinnen.

Demgegenüber steht als Nachteil der doch relativ hohe Zeitaufwand bei der Auszählung von im vorliegenden Fall 4 8oo Zellen pro Individuum, welcher sich bei schwacher Stimulation noch erhöht, wenn man ein statistisch relevantes Ergebnis erzielen will.

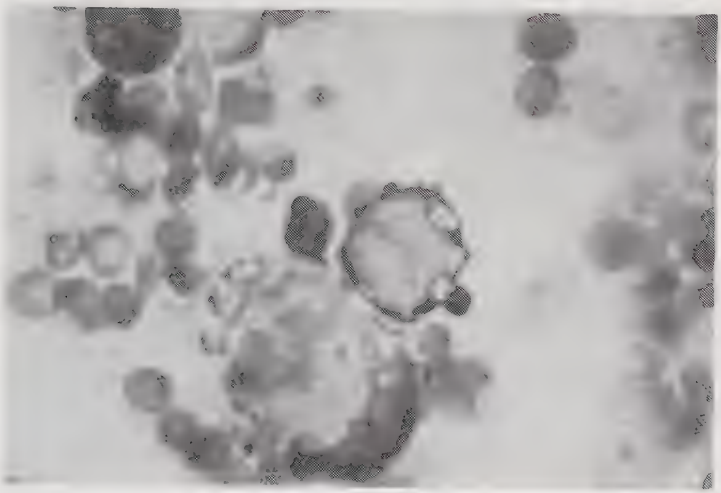
Die Subjektivität des Laboranten bei der Begutachtung muß durch ständige Rückkontrolle und große Routine ausgeglichen werden.

Nicht zuletzt trägt die spezifische Eigenschaft der Größe der Lymphoblasten zu einem erheblichen Fehler bei. Große Zellen kommen bei diesem Ausstreichen vermehrt am Rande zu liegen. Dies gilt im besonderen für Zellklone, die in ihrem Verband erhalten sind, während die kleinen Zellen vermehrt in die Mitte zu liegen kommen (67). Die Größe des Gesichtsfeldes des Mikroskops, Unterschiede in den Teilschritten beim mäanderförmigen Durchlaufen des Ausstriches, die wechselnde Schichtdicke des Ausstriches, sowie der unterschiedliche Haematokrit können zu unterschiedlichen Ergebnissen bei ein und derselben Kultur führen. Die Wertung der genannten Vor- und Nachteile kann nicht unabhängig von der Erwartung, die an diese Methode gerichtet wird, gesehen werden. Besteht die Bedeutung der Untersuchung in einer mehr orientierenden Diagnostik und tritt demgegenüber die meßbare Genauigkeit in den Hintergrund, so ist mit der Methode, die Lymphozytenkulturen mit Hilfe von Ausstrichen wie ein Differentialblutbild auszuzählen, ein von Speziallabors unabhängiges Verfahren von hinreichender Exaktheit gefunden worden.

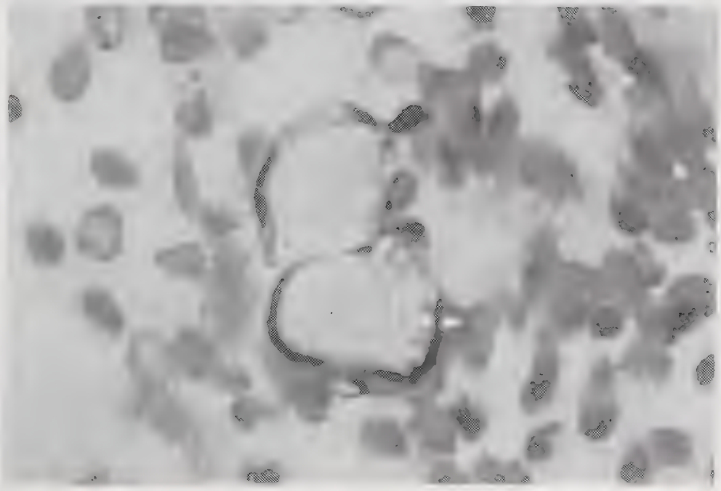
Werden jedoch quantitativ exakt reproduzierbare Ergebnisse, insbesondere auch zu abgestuften Vergleichen der Lymphozytentransformation als Immunantwort erwartet, erscheint ein größerer technischer Aufwand mit erfahrenem Fachpersonal, welches sich bereits Routine in dieser Methode angeeignet hat, erforderlich. Es sei in diesem Zusammenhang auch auf die Möglichkeit einer objektiven Zelldifferenzierung mit Hilfe des Haemalog D der Firma TECHNIKON INSTRUMENTS COOPERATION hingewiesen, welcher auf elektronischem und elektrooptischem Wege weiße Zellen nach Größe und Anfärbung unterscheidet.

3.4.2 Bilddokumentation (Abbildungen A-H )

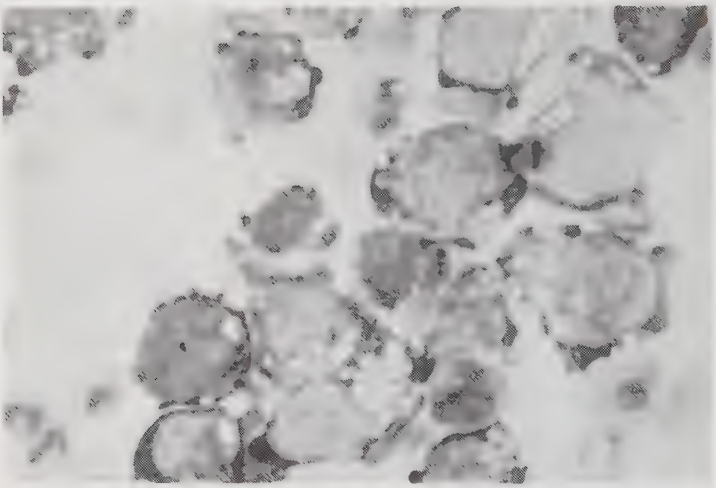
A



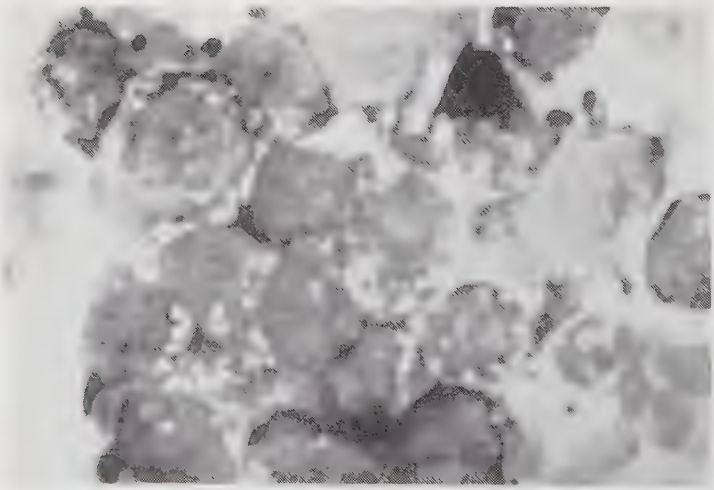
B



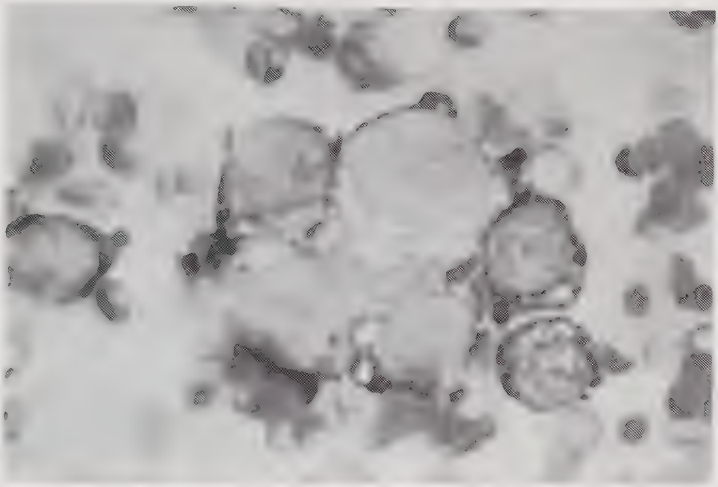
C



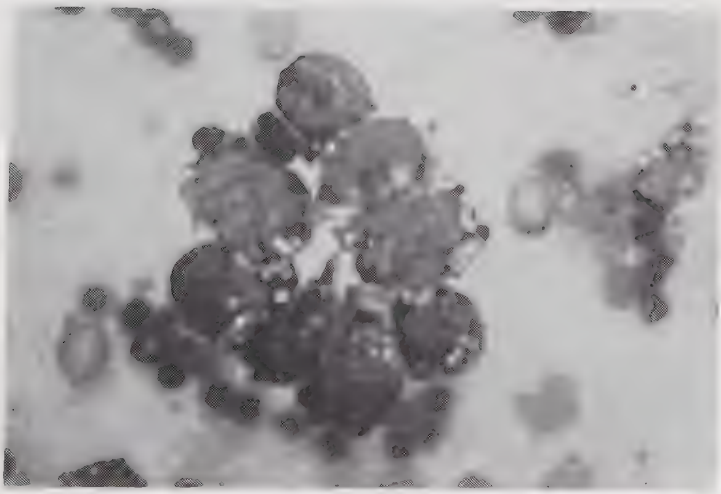
D



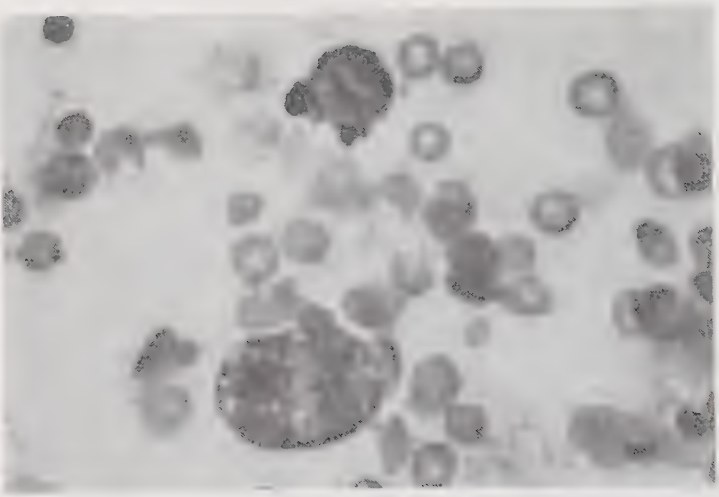
E



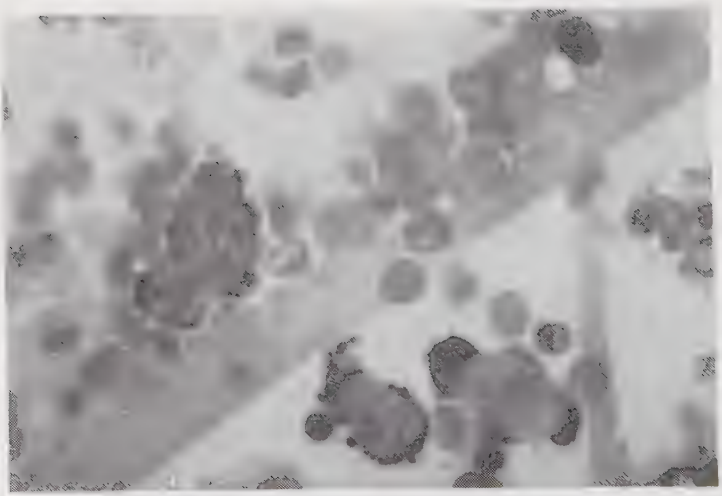
F



G



H



LEGENDE:

A: Große (3o µm) und mittelgroße (18 µm) blastenartige Zelle. Sehr großes Kern/Zytoplasma-Verhältnis. Starke Basophilie des Zytoplasmas. Unregelmäßige Zellbegrenzung. Gruppenartige Vakuolenbildung.

B: Etwas kleineres Blastenpaar mit pseudopodienartigen Zytoplasmaausstülpungen.

C: Typische Kolonieform mit Zellen unterschiedlicher Größe und Kern/Zytoplasmarelation.

D: Etwas größere Kolonie, sonst wie C.

E: Rosettenbildung, vermutlich um Zelldetritus als Adhaesionspunkt.

F: Rosettenbildung mit zum Teil engem Berührungskontakt, zum Teil mit Kontakt durch Plasmaausstülpung verbunden.

G: Mitose in der Telophase.

H: Weitere Teilungsformen.

## 3.4.3. Ergebnisse

### 3.4.3.1. Quantitativer Vergleich der Stimulationsergebnisse der einzelnen Tiere und Tieruntergruppen

Zur Beurteilung der Stimulationsergebnisse wurden die Tiere in drei Gruppen eingeteilt:

- Die nichtexponierten Tiere
- Die 3o Tage Be-exponierten Tiere
- Die 72 Tage Be-exponierten Tiere

Nichtexponierte Tiere

Die erste Gruppe umfaßt vier Tiere, darunter ein Weibchen. Bei den PHA-Kulturen dieser Tiere lag das Stimulationsergebnis bei ca. 21 bis 56%, bei den NaCl-Leerwerten bei 5 - 15%. Bei den berylliuminkubierten Kulturen unterscheiden sich zwei Gruppen prinzipiell voneinander: die Tiere 1 und 2 lagen mit allen Kulturen gering unter dem Leerwert, der die Backgroundstimulation anzeigte, die Tiere 3 und 4 lagen leicht darüber. Die allgemeine Tendenz dieser nicht berylliumexponierten Gruppe zeigte eine Stimulation bei der geringsten Berylliumkonzentration von o,o1 µg/5ml und fiel mit zunehmender Berylliumkonzentration ab. Das weibliche Tier wies in dieser Gruppe die höchste PHA-Stimulationsrate auf.

3o Tage berylliumexponierte Tiere

In der zweiten Gruppe, welche 3o Tage lang mit 4 µg/m$^3$ berylliumexponiert war, befanden sich zwei Tiere aus dem "Vorversuch" der Gruppe 1: Tier Nr.3 und Tier Nr.4. Tier Nr.3 reproduzierte im wesentlichen Werte der ursprünglichen Größenordnung vor der Stimulation. Tier Nr.4 wies eine allgemeine Depression des Stimulationsverhaltens auf. So waren nicht nur die PHA-, sondern auch die NaCl - Stimulationen und alle vier Antigenbereiche subnormal. Insgesamt war folgende Tendenz abzulesen: Die niedrigste Berylliumzugabe brachte das relativ höchste Stimulationsergebnis. Die übrigen Antigenzugaben

zeigten unterschiedliche Ergebnisse, jedoch zeigten das Tier Nr.3 ein Stimulationsmaximum bei o,o1 µg Be/5 ml und Tier Nr.5 im Bereich zwischen o,o1 und o,1 µg Be/5 ml Kulturmedium.

72 Tage berylliumexponierte Tiere

Der dritten Gruppe gehörte ein Tier (Nr.2) an, das bereits unexponiert untersucht worden war. Die PHA-Reaktion war gegenüber vorher erhöht, die NaCl-Reaktion eher niedriger. Die Antigenreaktion zeigte ein Maximum bei 1 µg Berylliumzugabe. Die übrigen Tiere zeigten eine gute PHA-Stimulierbarkeit und die Antigen-induzierten Reaktionen lagen in der Größenordnung der Leerwerte ohne Stimulation. Die allgemeine Tendenz glich der Gruppe von 1 und 2: Die niedrigsten Werte lagen bei der höchsten Antigenkonzentration. Die weiblichen Tiere unterschieden sich nicht augenscheinlich in ihrem Stimulationsverhalten. Es gab jedoch auch hier wieder zwei Tiere, die ein Maximum aufwiesen: Tier Nr.2 bei o,1 µg Be/5 ml und tendenziell Tier Nr.9 zwischen o,o1 und o,1 µg Be/5 ml Kulturmedium.

Aus den geschilderten Beobachtungen sind folgende Schlußfolgerungen zu ziehen:

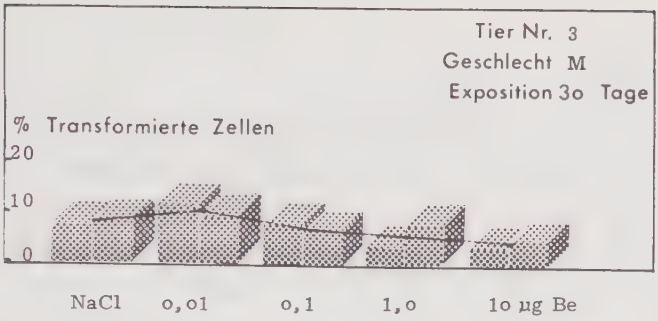
1. Die Stimulationsrate der 3o und 72 Tage gegenüber einer Konzentration von 4 µg Be/$m^3$ exponierten Tiere ist gegenüber den nichtexponierten Tieren nicht erhöht. Alle Werte sind größenordnungsmäßig im Bereich des Leerwertes angesiedelt. Im Gegensatz zu einem positiven Stimulationsergebnis ist eher eine geringe Tendenz zur Stimulationsdepression der exponierten Tiere zu konstatieren.

2. Das von ZELLER bei höheren Berylliumkonzentrationen exponierten Ratten gefundene Stimulationsmaximum bei einer Antigenkonzentration von 0,1 µg Be/5 ml konnte lediglich bei 2 von 4 der 3o Tage exponierten und bei 2 von

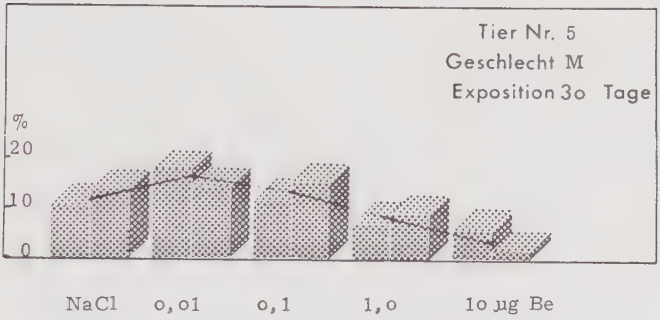
7 der 72 Tage exponierten Tiere nachvollzogen werden. Die Expositionskurve zeigte allenfalls eine Tendenz zum allgemein konzentrationsabhängigen Abfall der Stimulationsmittelwerte, wobei das Stimulationsmaximum bei o,o1 ug Be/5 ml lag.

3. Dieses Ergebnis ist eher mit einer Stimulationsunterdrückung nach Berylliumexposition zu interpretieren.

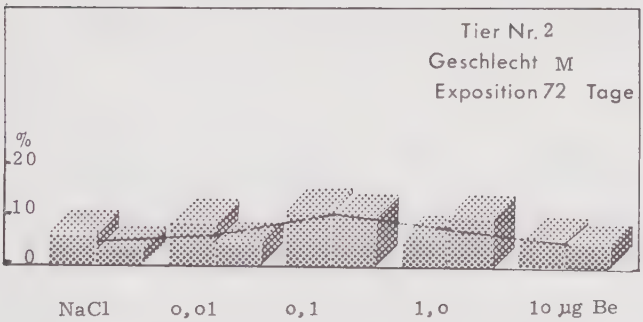
Schaubild 2 - 5



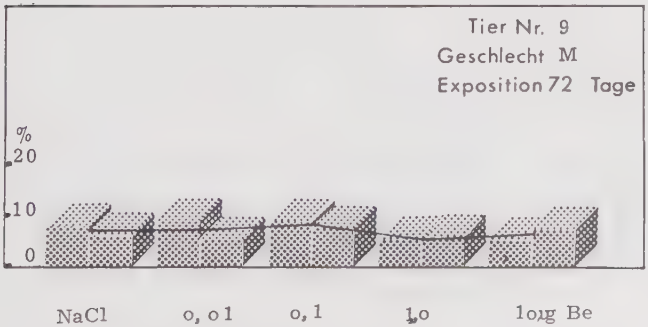

2




2




4




5

3.4.3.2. Statistik

Die Ergebnisse der quantifizierten Stimulationsergebnisse wurden varianzanalytisch verarbeitet, d.h. die Mittelwerte der obengenannten Untergruppen wurden auf Differenzen und signifikante Abweichungen hin untersucht, um die Fehlerstreubreite der Einflußgrößen verschiedener Faktoren bei den Meßdaten gegenüber den Ergebnissen zu relativieren (34).

Gegenübergestellt wurden die nichtexponierten Tiere den einfach und den doppelt exponierten Tieren. Ferner wurden die Ergebnisse sämtlicher Tiere untereinander verglichen. Da von jedem Versuch zwei Kulturen angelegt wurden, erfolgte hier ebenfalls eine Überprüfung, sowie von Ausstrichen jeder Kultur. Auch die unterschiedlichen Kulturzusätze wurden dem Verfahren unterzogen. Dabei zeigte sich, daß die PHA-Kulturen grundsätzlich signifikant über den übrigen Meßdaten lagen. Sie wurden deshalb bei der übrigen Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Die mit NaCl ermittelten Leerwerte lagen in der Größenordnung der übrigen Meßdaten und waren statistisch nicht von diesen zu trennen.

Die Analyse bestätigte im wesentlichen obengenannte Aussage. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von allerdings o,5 waren die exponierten Tiere von den nichtexponierten Tieren nicht zu unterscheiden. Unterschiede ergaben sich aus folgenden Quellen:

1 Die einzelnen Wistarratten unterschieden sich im Verhalten des Ansprechens ihrer zellulären Immunität gegenüber PHA und Beryllium erheblich. Es gab da sowohl inter- als auch intraindividuelle Unterschiede - ein Befund, der aus Beobachtungen beim Menschen bekannt ist.

1,2 Es gab Wechselwirkungen zwischen den Tieren und den Versuchen, d.h. es wurden nicht alle Kulturen bei jedem Tier unter den absolut gleichen Bedingungen angelegt.

1, 2, 3 Es gab ferner Wechselwirkungen zwischen den Tieren, den Versuchen und den Antigenzusätzen, d.h. es gab Unterschiede bei den einzelnen Antigenzusätzen bei manchen Kulturansätzen.

3, 4 Hier gingen die Ausstriche im Verhältnis zu den Antigenzusätzen ein. Die Ausstrichsqualität war nicht bei allen Röhrchen eines Versuches gleich.

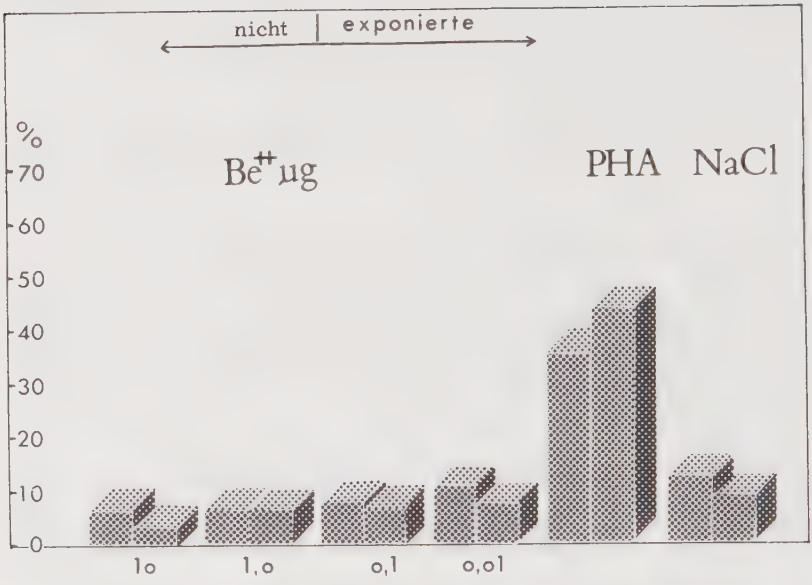
2, 3, 4 Wechselwirkungen zwischen den Versuchen, den Antigenzusätzen und den Ausstrichen. Hier wurden die Unterschiede zwischen den nicht an einem Tage angesetzten Kulturen miteinander verglichen, d.h. die Streubreite von einem Tag zum anderen errechnet.

Die Mittelwerte der exponierten und der nichtexponierten Tiere sind auf folgender Tabelle 2 und dem folgenden Schaubild 6 dargestellt:

Tabelle 2

| | ohne | mit Exposition |
|---|---|---|
| PHA | 34,9 | 42,3 |
| NaCl | 11,3 | 9,7 |
| 0,01 µgBe | 10,8 | 8,5 |
| 0,1 µgBe | 7,8 | 7,4 |
| 1 µgBe | 6,6 | 6,6 |
| 10 µgBe | 6,6 | 5,4 |

Schaubild 6


nicht | exponierte
%
70
60
50
40
30
20
10
0
Be++µg
PHA
NaCl
1o
1,o
o,1
o,o1

# IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE UNTER EINBEZIEHUNG DER EINFLUSSGRÖSSEN AUF DEN VERSUCH

## 1. Die Einflußgrößen

Ganz allgemein lassen sich generelle Faktoren von speziell im vorliegenden Versuch zu berücksichtigenden Einflüssen unterscheiden.

In der gegebenen Reihenfolge sind im einzelnen folgende Punkte zu beachten, welche in die Ergebnisse eingehen:

a) Versuchsplanung
b) Wahl von Spezies und Geschlecht der Versuchstiere
c) Haltung der Tiere rein technisch und im Hinblick auf die Hygiene
d) Expositionsbedingungen
e) Narkose und Blutabnahme
f) Behandlung des Blutes
g) Zusammensetzung und Verarbeitung des Nährmediums
h) Konzentration der antigenen Zusätze
i) Kontaktmaterialien mit dem Kulturmedium
j) Zeitraum der Inkubation
k) Technik der "Ernte" und Reproduzierbarkeit der Ausstrichtechnik
l) Mikroskopische Beurteilung der Ausstriche

## 2. Diskussion

Bei der folgenden Besprechung der Stichworte werden die Besonderheiten des vorliegenden Versuches mitberücksichtigt.

a) Bei der Planung eines Versuchs werden die Versuchsdauer, die Expositionsdauer, die Tierzahl und die prinzipielle Wahl der Untersuchungsmethoden als Konzept festgelegt. Dieses Konzept geht prinzipiell in allen Punkten in das Ergebnis ein. Im vorliegenden Fall waren besonders wichtige Punkte die relativ geringe Anzahl der Tiere (N = 12) und der Plan, die Tiere nach der Blutabnahme weiterzuverwenden. Je geringer die Zahl der Tiere, um so größer wird der individuelle Einfluß auf das Ergebnis, dessen Verallgemeinerung um so problematischer wird.

Die Weiterverwendung der Tiere setzt Narkose- und Blutabnahmeverfahren voraus, die Veränderung der Immunabwehrlage durch Schwächung, Infektion und Stress weitgehend vermeiden. Insbesondere ist die zur Verfügung stehende Menge an Blut naturgemäß äußerst begrenzt und auf Reserven kann nicht ohne Umgehung der genannten Prinzipien zurückgegriffen werden.

b) Die Wahl der Spezies geht einmal im artenspezifischen immunologischen Verhalten dieser Organismen, sowie in der Lebensdauer, der Resistenz gegen Erkrankungen, in der Tumoranfälligkeit und dem Stressverhalten in die Ergebnisse ein. Wie oben ausgeführt, ist auf das immunologische Verhalten auch das Geschlecht der Tiere von Einfluß.

Im Versuch waren daher zunächst auch Ausfälle von Tieren durch technische Probleme und Krankheiten zu verzeichnen, welche das Konzept durchkreuzten, die Tiere nach der ersten Blutabnahme weiterzuverwenden, um die Ergebnisse intraindividuell vergleichen zu können. Ebenfalls verhindert wurde dadurch der Plan des Untersuchers, eine gleich große weibliche und männliche Tiergruppe zu untersuchen. Ratten sind dafür bekannt, sehr stressanfällig zu sein. Persönlichen Mitteilungen zu Folge ist es eine ungeklärte Tatsache, daß zum Beispiel an Föhntagen mehr Ratten in der Narkose ad exitum kommen, als sonst. Der Narkoseeinfluß auf die Tiere ist daher nicht zu unter-

schätzen. Wistarratten gelten als relativ tumoranfällig. In einer persönlichen Mitteilung an den Untersucher war zu erfahren, daß Monate nach Versuchsende zwei dieser Tiere Tumore im abdominellen Bereich entwickelten, welche nicht unbedingt mit der Berylliumexposition in Zusammenhang gebracht werden müssen. Eine histologische Untersuchung erfolgte leider ebensowenig, wie die Identifikation der Tiere. Das gegenüber Meerschweinchen geringere Sensibilisierungsverhalten, welches auch in den diesbezüglichen vergleichbaren Untersuchungen von ZELLER und BANDTEL zum Ausdruck kommt, konnte im vorliegenden Versuch bestätigt werden.

c) Die Tierhaltung hat neben hygienischen Aufgaben ebenfalls die Stressreduktion zu unterstützen. Ein Tag/Nachtrhythmus ist in tageslichtlosen Räumen aufrechtzuerhalten. Dabei müssen Lampen verwendet werden, wie sie auch an menschlichen Arbeitsplätzen Vorschrift sind. Die Einzeltierhaltung in Stoffwechselkäfigen bringt hinsichtlich individueller Beobachtung und Behandelbarkeit Vorteile, bedeutet jedoch eine psychosoziale Ausnahmesituation für die Tiere und somit wieder Stress.

Eine weitere Feststellung , charakterisiert durch die Art der Tierexposition in den Käfigen, war der Aerosolniederschlag im Fell und an der Behälterglaswand. Durch individuell unterschiedliches Putzen und Lecken, sowie Hautkontakt mit $Be^{++}$, wurde ein Unterschied zugelassen, der nur durch Röhrenhaltung und Masken zu vermeiden gewesen wäre.

Die technische Durchführung der Belüftung im Saugbetrieb war von entscheidender Bedeutung. Es stellte sich bald heraus, daß die Standzeiten einer zentralen Pumpenanlage in Dauerbetrieb bei der langen Verweildauer der Tiere in den Käfigen weit überschritten wurden. Um Ausfälle zu verhindern, mußte eine Ersatzanlage automatisch zuschaltbar sein, oder durch Dezentralisierung der Pumpen die kollektive Gefahr des Erstickungstodes oder des Hypoxiestresses ausge-

schaltet werden. Der zweite Weg wurde mit äußerst zuverlässigen Membranpumpen aus dem Aquariumfachhandel beschritten, welche abgedichtet und spirometrisch eingestellt und geeicht wurden. Zur genauen und allseits gleichen Einstellung des Käfigflows mußte ein Einstellventil und ein Meßinstrument bei jedem Käfig zusätzlich angebracht werden. Hier war neben der Lösung technischer Probleme auch ein großer Überwachungsaufwand zu bestreiten.

Weitere Fehlerquellen waren in der Gesamtdurchflußmenge verborgen, da bei Membranpumpen nicht mehr von einer laminaren Luftströmung ausgegangen werden konnte. Die benutzten Flowmeter wurden daher neu geeicht und die Messungen an Hand der Eichkurve durchgeführt. Desweiteren brachte die große Oberfläche des Käfigsystems einen bedeutenden Kondensniederschlag des Aerosols mit sich. Dies mußte durch eine zeitliche Vorgabe bei der Vernebelung ausgeglichen werden, um Berylliumverluste in der Atemluft zu vermeiden.

d) Die Expositionsbedingungen wurden z.T. bereits oben beschrieben. Ein Aerosol hat gegenüber einer Berylliumexposition am Arbeitsplatz, die aus Stäuben und Feuchtaerosolen besteht, andere physikalische und chemische Eigenschaften (siehe Kapitel II, 5.1.). Daher ist die Übertragung der Ergebnisse auf die realen Verhältnisse nicht ohne weiteres möglich. Dennoch wurde die Aerosolexposition gewählt, da sich die Handhabung des Aerosols bei einer Einzeltierhaltung weitaus genauer gestalten läßt.

Die Festsetzung der vernebelten Menge ist willkürlich und orientiert sich an Beobachtungen aus der Arbeitsmedizin und anderen Tierversuchen. Bei Ratten ist jedoch grundsätzlich die Beobachtung der extrem hohen LD 5o miteinzubeziehen (2,5 g/kg Körpergewicht subcutan). Geht man daher von einer grundsätzlich geringeren Empfindlichkeit dieser Spezies gegenüber Beryllium aus, so stellt der doppelte ehemalige MAK-Bereich von 4 $\mu g/m^3$ eine untere Grenze dar. Der Bereich wurde jedoch gewählt, um den größenordnungsmäßigen Vergleich

mit der Arbeitswelt einhalten zu können.

Die Dauer der Exposition sollte eine mögliche Reaktion des Rattenorganismus begünstigen, wobei bezüglich des kurzen Rattenlebens ein Monat nahezu zwei Jahren eines Menschenlebens entspricht. Somit wurde eine mehrjährige menschliche Exposition simuliert. Der Versuch wurde zweistufig angelegt (3o und 72 Tage), um eben diesen Einfluß beobachten zu können.

Die Konzentrationsmessungen erfolgten mit Hilfe von Filterpapieren, die dicht in den Luftstrom bei nachgeeichtem Flow eingebaut wurden. Die Berylliumbestimmungen erfolgten atomabsorptionsspektographisch. Die Meßwerte lagen im errechneten Größenordnungsbereich, zeigten jedoch Einzelschwankungen. Es ist daher auch hier mit Unterschieden von Tier zu Tier und von Tag zu Tag rechnen.

e) Die Narkose beeinflußt die Ergebnisse über den besprochenen Stressfaktor und über die Möglichkeit, ein Tier zu verlieren. Ferner sind Unterschiede in der Narkosegasgemischkonzentration, der Narkosetiefe und -dauer nicht zu vermeiden. Ein standardisiertes Verfahren und dessen Übung in einem Kurs an der Tierabteilung der Firma THOMAE in Biberach sollten diese Fehlerquellen möglichst minimieren.

Die Blutabnahme über den medianen Augenwinkel birgt neben der Verletzungsmöglichkeit auch eine Infektionsgefahr. Ferner kann sich ein verletztes Auge entzünden und dabei ganz verloren gehen. Mit sterilisierten Kapillaren, deren eigens angefertigten Schnittenden zuvor genau kontrolliert wurden, konnten die geschilderten Komplikationen, welche eine Änderung der Abwehrlage hätten nach sich ziehen können, verhindert werden.

Ein weiteres Problem stellte die Unsicherheit dar, die gewünschte Menge von 2o Tropfen Blut (nach Verwerfen der ersten zwei Tropfen) zu erhalten. Bindegewebefetzen und Fibrinfäden, die das Lumen der

nicht heparinisierten Kapillare verstopften, konnten zu Fehlern in der Blutmenge und daher in der pro Milliliter Kultur inkubierbaren Zellzahl führen. Leukozytenzählungen der Tiere ergaben Werte zwischen 5 und 9 x $1o^3$ Leukozyten pro $mm^3$, d.h. in 2o Tropfen Blut war bei 12 Kulturen à 5 ml mit durchschnittlich 1,25 x $1o^5$ weißen Zellen pro Milliliter Kulturmedium zu rechnen. Der reine Lymphozytenanteil lag entsprechend geringer. LING empfiehlt bei gemischtzelligen Kulturen eine Mindestzellzahl von $1o^5$ Lymphozyten. Im vorliegenden Versuch wurde diese Zellzahl knapp unterschritten und erklärt unter Umständen auch das etwas geringere PHA-Stimulationsergebnis gegenüber anderen Autoren.

f) Die Weiterbehandlung des Blutes umfaßt Zellwäsche, Zentrifugation, Abheben des Überstandes und gleichmäßige Verteilung des Zentrifugats auf alle 12 Kulturen. Diese Manipulationen müssen schonend durchgeführt werden, um Zellzerstörungen zu vermeiden. Besonders erwähnenswert in Bezug auf Fehlerquellen sind das Abheben des Überstandes und die Verteilung der zentrifugierten Zellen in die Kulturröhrchen.

Beim Abheben des Überstandes besteht eine große Gefahr darin, die an der Oberfläche des Zentrifugats locker liegende Leukozytenschicht aufzuwirbeln und mit abzusaugen. Dem wurde mit einer entsprechenden Apparatur Rechnung getragen (siehe Schema 6 III, 3.2.3.2.). Bei der Verteilung des Zentrifugats entstehen zwangsläufig Zellverluste durch Verbleib eines Restes im Zentrifugenglas. Ferner muß die Menge im Zentrifugenglas eine durch 12 teilbare Tropfenzahl umfassen, um Verluste oder Fehler beim Beschicken der Kulturen zu vermeiden.

g) Bei der Zusammensetzung des Nährmediums wird von LING bei Nagern eine entscheidende Bedeutung dem Anteil von foetalem Kälberserum (FCS) am übrigen Nährmedium zugeschrieben. FCS enthält da-

bei allerdings trotz Hitzedesaktivierung selbstverständlich antigene Substanzen. Daher ist auch die Backgroundstimulation damit z.B. bei Ratten höher als mit autologem Serum. Dafür zeigte es aber bessere Kulturergebnisse als letzteres. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, daß im Versuch der NaCl-Wert durchgehend in der Größenordnung von 1o% liegt. Damit wäre ebenfalls das negative Stimulationsergebnis untermauert.

Eine weitere Fehlerquelle stellt das Puffersystem dar. Es genügt nach der Erfahrung des Untersuchers nicht, mit wenigen Tropfen Bicarbonat den pH auf Werte zwischen 7,3 und 7,4 einzustellen. Es ist vielmehr im Interesse einer möglichst hohen Pufferkapazität, eine größere Menge Bicarbonat zuzugeben und den pH mit der Einleitung sterilgefilterten $CO_2$ einzustellen.

h) Die Konzentration der antigenen Zusätze wurde den Erfahrungen anderer Autoren entnommen (ZELLER, BANDTEL, 2, 1o1). Dabei mußte zwangsläufig eine Optimierung der Reaktion auf die verwendete PHA-Charge entfallen. Dies könnte ein weiterer Grund für die relativ geringe durchschnittliche Stimulationsrate der PHA-Kulturen sein. Unter den Berylliumzugaben zeigten die Kulturen mit o,o1 µg Be/5 ml die dem Leerwert am nächsten stehenden Stimulationsergebnisse. Es wäre hier zu überlegen, ob nicht noch geringere Konzentrationen ein Ansteigen der Stimulation über den Leerwert bewirken könnten. Dann wäre im vorliegenden Falle einfach der optimale Konzentrationsbereich noch nicht getroffen worden. Bliebe aber eine Stimulationsänderung aus, würde dies die These stützen, daß der Versuch eine berylliumbedingte, zelltoxische Kulturkomponente darstellte, oder daß eine Tendenz zur aerosolinduzierten Immunsupression bei Ratten vorhanden ist, wie es bei Meerschweinchen gefunden wurde. Letzteres erscheint dem Untersucher eher unwahrscheinlich, da dann ein Stimulationsminimum erwartet werden müßte, welches schon vor der auch von ZELLER und BANDTEL als toxisch beurteilten Konzentration von

1o µg Be/5 ml Kulturmedium liegen müßte.

i) Naturgemäß sind immunreaktionsauslösende Substrate, wie z.B. Gammaglobuline, Bakterien, Viren und sämtliche andere Verschmutzungen beim LTT zu vermeiden. Sterilität allein genügt nicht. So ist bei allen zu verwendenden Gerätschaften und Instrumenten auf Vermeidung jeder Kontamination schon vor der Sterilisation zu achten.

Eine besondere Bedeutung kommt dem Material der Kulturröhrchen zu. Es ist zu fordern, daß seitens des Materials und des Herstellungsprozesses eine innere Oberfläche geschaffen ist, die neben einer hohen Sauberkeit auch frei von Wechselwirkungen mit dem Inhalt bleibt. Zu denken wäre hier an Adsorptionsvorgänge wichtiger Elektrolyte und ähnliches, Reaktionen mit Inhaltstoffen der Kulturen eventuell sogar zu Verbindungen mit Antigencharakter, oder auch Rückstände aus dem Herstellungsprozeß. Z.B. wird Zinkstearat als Gleitmittel zum Entfernen der Röhrchen aus der Preßform verwendet.

Vom Untersucher wurden cobaltsterilisierte Polystyrolröhrchen verwendet. Eine analytische Untersuchung der inneren Oberfläche der Röhrchen im MAX - PLANK - INSTITUT für Festkörperforschung in Stuttgart-Büsnau ergab keine meßbaren Konzentrationen von Zink oder anderen Schwermetallen. Allerdings konnten geringe Mengen an Eisen nachgewiesen werden. Eine diesbezügliche Ursache für den hohen NaCl-Stimulationswert scheidet aus.

j) Die Inkubationsdauer wird von der Fragestellung des Versuchs diktiert. Wegen der Gefahr der Erschöpfung des Nährmediums, seines pH, der Gefahr von Infektionen und Austrocknungsvorgängen, strebt man eine dem Zweck der Kultur entsprechende, aber dennoch möglichst geringe Kulturdauer an. Wie in Kapitel II, 6.3.2.1. ausgeführt, ist bei PHA-induzierten Kulturen mit einem Maximum nach zwei bis drei Tagen, bei antigener Stimulation nach ca. fünf Tagen = 12o Stunden zu rechnen.

Ein 5% $CO_2$-Luftgemisch und zum Teil eine Anfeuchtung werden allgemein zur Aufrechterhaltung eines optimalen Brutraummilieus und zur Erhaltung des Puffermilieus in den Kulturen über diesen Zeitraum empfohlen. Die Röhrchen müssen dabei allerdings offen bleiben. Daher ist auf strenge Sterilität zu achten.

k) Bei der "Ernte" und der Ausstrichtechnik stellt sich das Problem eines für jede einzelne Untersuchung des Versuchs reproduzierbaren Verfahrens. Die Gefahr besteht darin, vor oder nach dem Durchmischen der verbliebenen Kulturzellen und dem Zentrifugieren, ein in jedem Röhrchen gleiches Volumen beim Absaugen des Überstandes zurückzulassen, bzw. für einen immer gleichen Haematokrit zu sorgen. Obengenannte technische Hilfe und die Methode, den Überstand ohne vorheriges Aufschütteln direkt abzusaugen, schufen günstige Voraussetzungen, den Fehler klein zu halten. Bedingung dafür war jedoch die Annahme, daß immer ungefähr gleich viele Zellen in jedem Röhrchen entweder überlebt oder sich gebildet hatten. Das nachträgliche Aufschütteln ist unumgänglich, da eventuell vorhandene Zellklumpen sich beim Ausstreichen an den Rand des Objektträgers schieben und überhaupt die Homogenität des Ausstriches beeinträchtigen. Der auszustreichende Tropfen sollte aus genannten Gründen immer dasselbe Volumen haben.

l) Daß die mikroskopische Auszählung der Ausstriche stark vom Untersucher abhängt, wurde bereits oben erwähnt. Es wird auf das Kapitel III, 3.1.4.1.1. verwiesen.

Als die wichtigsten Einflußgrößen, welche auf den Versuch eingewirkt haben, sind zusammenfassend zu nennen:

- Die Tierspezies
- Die individuellen Unterschiede im Verhalten der einzelnen Tiere
- Die Expositionsbedingungen
- Die Zellzahl pro Kultur

- Die Zusammensetzung des Nährmediums
- Die Methoden der "Ernte"
- Die mikroskopische Beurteilung der Ausstriche

Angesichts der dargelegten Einzelprobleme und Einflußgrößen ist in einem Labor eine große Erfahrung und Genauigkeit bei der Durchführung des LTT zu fordern, um reproduzierbare Ergebnisse durch Ausschaltung obengenannter Beobachtungen erzielen zu können.

## 3. Zusammenfassung

A Mit Hilfe des Lymphozytentransformationstestes in der Mikrovollblutmethode wurden Ratten (N = 12) vor, während und nach Abschluß einer Langzeitexposition mit einem $BeSO_4$-Aerosol im doppelten ehemaligen MAK-Bereich (4 µg Be/$m^3$) untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede im Stimulationsverhalten konnten weder nach 3o tägiger noch nach 72 tägiger $BeSO_4$-Exposition festgestellt werden. Die unterschiedlichen Antigenkonzentrationen in den Lymphozytenkulturen betrugen o,o1, o,1, 1,o und 1o µg Beryllium pro 5 ml Kulturmedium. Die Stimulationsergebnisse lagen im Durchschnitt in der Höhe des Leerwertes oder darunter. Bei zwei der vier 3o Tage exponierten Tiere und bei zwei der sieben 72 Tage exponierten Tiere fand sich ein Stimulationsmaximum zwischen o,o1 und o,1 µg Be/5 ml. Dabei ließ sich die Tendenz zu schlechteren Stimulationsergebnissen bei ansteigender Antigenkonzentration erkennen, jedoch nicht statistisch sichern. Das Ergebnis wird als nicht erfolgte Sensibilisierung der Ratten unter genannter $BeSO_4$-Exposition gewertet. Ein zelltoxischer Einfluß von Beryllium in den genannten Antigenkonzentrationen muß diskutiert werden.

B Die Einflußgrößen, welche auf den Expositionsversuch und den Lymphozytentransformationstest gewirkt haben, wurden untersucht und diskutiert. Als wesentlich wurden befunden: Die Tierspezies, die individuellen Unterschiede der Tiere, die Expositionsbedingungen, die Zellzahl pro Kultur, die Zusammensetzung des Nährmediums, die Methoden der Kulturernte und die mikroskopische Beurteilung der Ausstriche. Die Durchführung des Lymphozytentransformationstestes sollte einem in der Methode erfahrenen Labor übertragen werden.

Tabellen 3 - 17

Tier Nr. 1
Geschlecht W
Exposition O Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 1 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 57,25 | 54,25 | 55,75 |
| NaCl | 12,00 | 24,88 | 18,44 |
| o,o1 µgBe | 12,25 | 14,50 | 13,37 |
| o,1 µgBe | 7,25 | 6,00 | 6,62 |
| 1 µgBe | 6,75 | 5,00 | 6,75 |
| 1o µgBe | 7,25 | 9,50 | 8,50 |

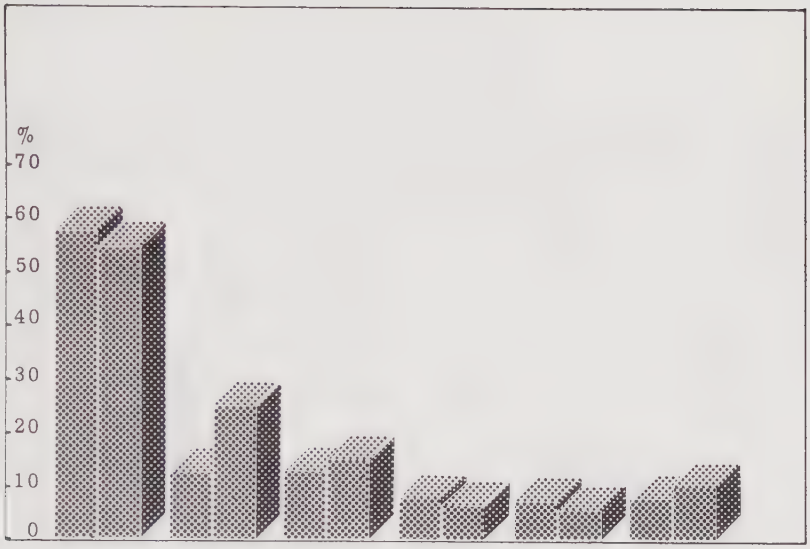
Legende siehe S.59, 3.3.3.

Tier Nr. 2
Geschlecht M
Exposition 0 Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 2 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 20,00 | 22,00 | 21.00 |
| NaCl | 14,75 | 15,50 | 15,12 |
| o,o1 µgBe | 10,00 | 12,00 | 11,00 |
| o,1 µgBe | 7,00 | 9,75 | 8,37 |
| 1 µgBe | 2,25 | 5,75 | 4,12 |
| 1o µgBe | 3,00 | 4,00 | 3,50 |

Schaubilder .7 - 21




(in den folgenden entsprechend)

Tier Nr. 3
Geschlecht M
Exposition 0 Tage

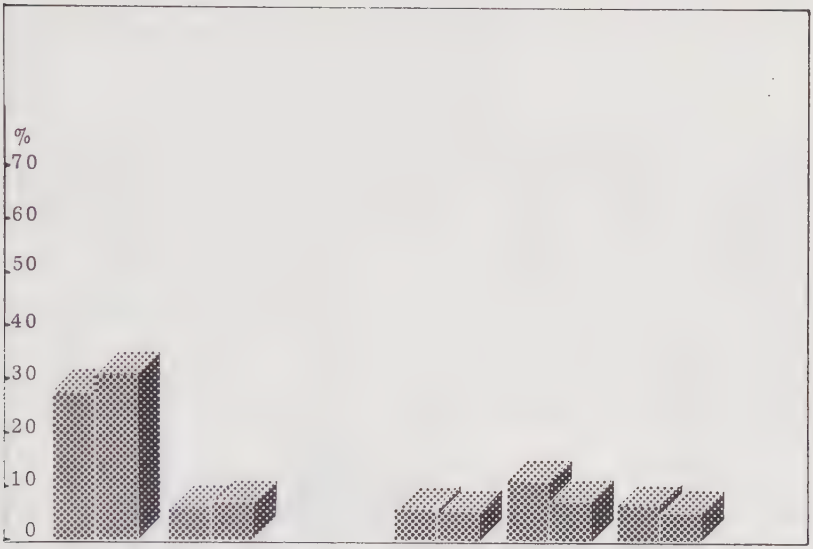
Transformierte Zellen

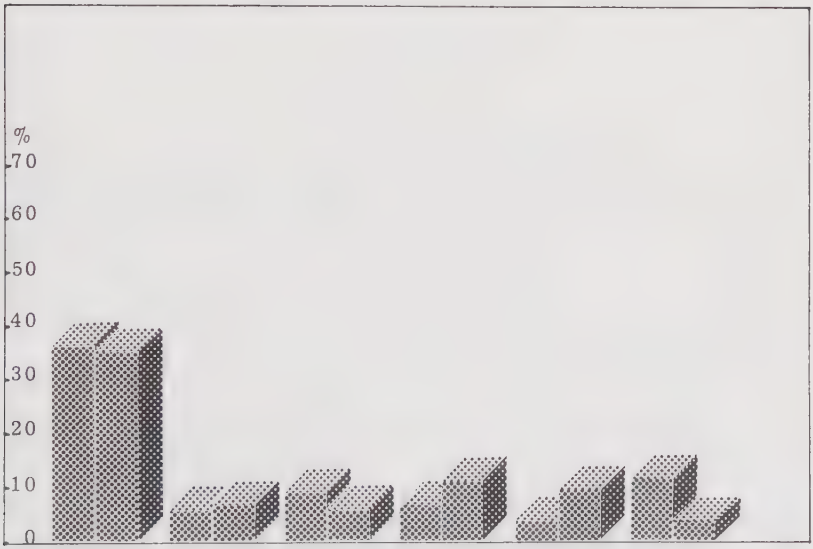
| Versuch 3 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 27,50 | 30,50 | 29,00 |
| NaCl | 5,50 | 7,00 | 6,25 |
| 0,01 µgBe | | | |
| 0,1 µgBe | 5,50 | 5,25 | 5,37 |
| 1 µgBe | 10,75 | 7,00 | 8,87 |
| 10 µgBe | 6,50 | 5,00 | 5,75 |

Tier Nr. 4
Geschlecht M
Exposition 0 Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 4 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 36,00 | 34,75 | 35,37 |
| NaCl | 5,00 | 6,25 | 5,62 |
| 0,01 µgBe | 8,50 | 5,50 | 7,00 |
| 0,1 µgBe | 6,00 | 10,75 | 8,37 |
| 1 µgBe | 3,75 | 9,25 | 6,50 |
| 10 µgBe | 11,00 | 3,50 | 7,25 |


%
70
60
50
40
30
20
10
0


%
70
60
50
40
30
20
10
0

Tier Nr. 3
Geschlecht M
Exposition 3o Tage

Transformierte Zellen

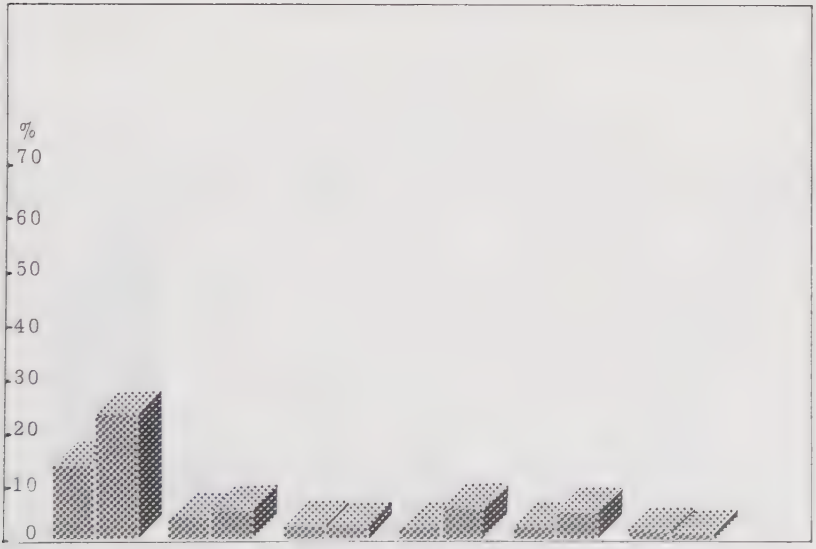
| Versuch 5 | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 29,00 | 27,25 | 28,12 |
| NaCl | 7,00 | 8,25 | 7,62 |
| o.o1 µgBe | 11,25 | 9,00 | 10,12 |
| o.1 µgBe | 7,50 | 6,50 | 7,00 |
| 1 µgBe | 3,25 | 7,50 | 5,37 |
| 1o µgBe | 3,00 | 5,00 | 4,00 |

Tier Nr. 4
Geschlecht M
Exposition 3o Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 6 | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 13,25 | 23,00 | 18,12 |
| NaCl | 4,00 | 5,25 | 4,62 |
| o,o1 µgBe | 2,50 | 2,00 | 2,25 |
| o,1 µgBe | 2,50 | 4,75 | 3,62 |
| 1 µgBe | 2,00 | 5,50 | 3,75 |
| 1o µgBe | 1,50 | 1,00 | 1,25 |

%
70
60
50
40
30
20
10
0


%
70
60
50
40
30
20
10
0

Tier Nr. 5
Geschlecht M
Exposition 3o Tage

Transformierte Zellen

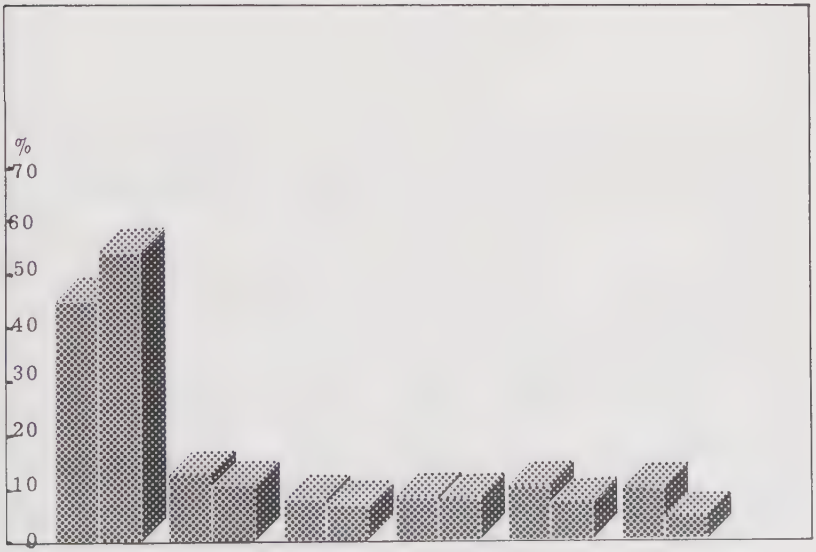
| Versuch 7 | $\bar{X}$ von $a_I . a_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $b_I . b_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $a_I . a_{II} . b_I . b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 42,50 | 48,25 | 45,37 |
| NaCl | 10,00 | 13,25 | 11,62 |
| 0,01 µgBe | 17,50 | 14,00 | 15,75 |
| 0,1 µgBe | 11,50 | 15,00 | 13,25 |
| 1 µgBe | 6,75 | 9,00 | 7,87 |
| 1o µgBe | 5,25 | 1,25 | 3,25 |

Tier Nr. 6
Geschlecht W
Exposition 3o Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 8 | $\bar{X}$ von $a_I . a_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $b_I . b_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $a_I . a_{II} b_I . b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 44,25 | 53,50 | 48,87 |
| NaCl | 12,00 | 10,00 | 11,00 |
| 0,01 µgBe | 7,50 | 6,35 | 6,93 |
| 0,1 µgBe | 7,75 | 7,25 | 7,50 |
| 1 µgBe | 9,75 | 6,75 | 8,25 |
| 1o µgBe | 9,25 | 4,00 | 6,62 |

%
70
60
50
40
30
20
10
0


%
70
60
50
40
30
20
10
0

Tier Nr. 2
Geschlecht M
Exposition 72 Tage

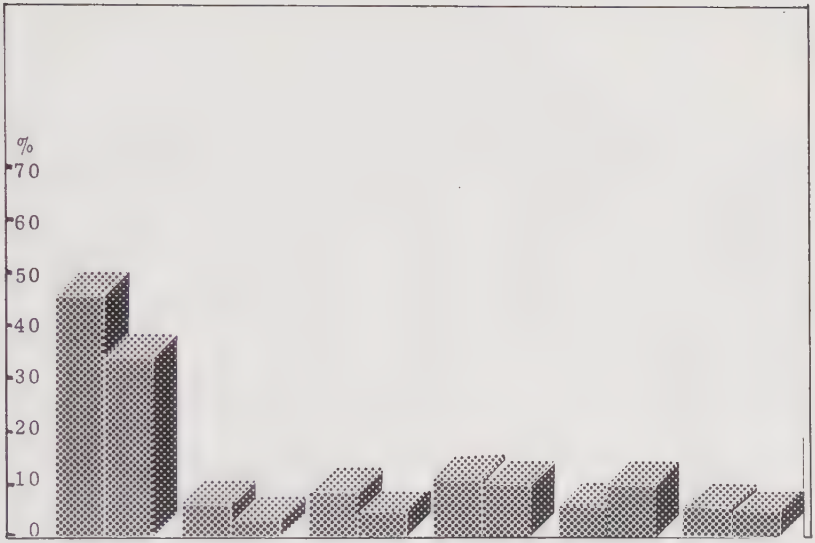
Transformierte Zellen

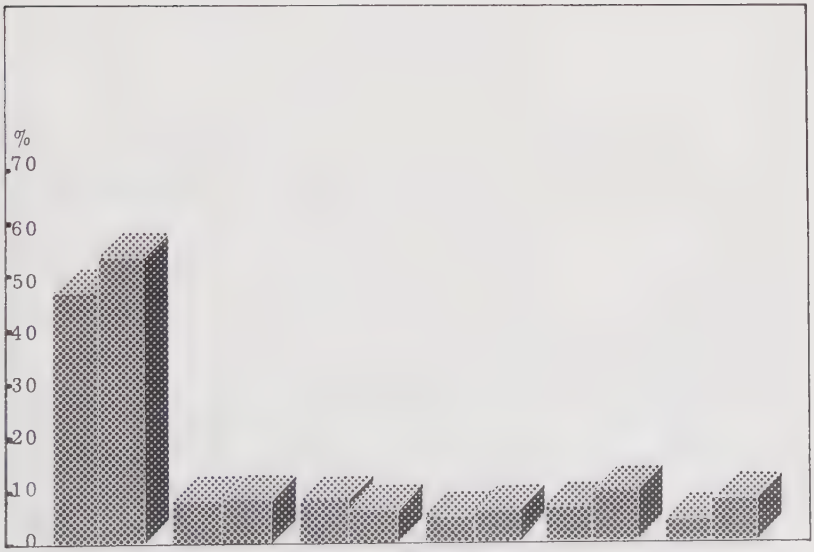
| Versuch 9 | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 45,12 | 33,64 | 39,38 |
| NaCl | 5,75 | 2,75 | 4,25 |
| o,o1 µgBe | 8,75 | 4,25 | 6,50 |
| o,1 µgBe | 10,25 | 9,69 | 9,97 |
| 1 µgBe | 5,50 | 9,64 | 7,57 |
| 1o µgBe | 5,00 | 4,50 | 4,75 |

Tier Nr. 7
Geschlecht W
Exposition 72 Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 10 | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{X}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 46,25 | 53,00 | 49,62 |
| NaCl | 7,75 | 8,00 | 7,87 |
| o,o1 µgBe | 7,75 | 6,00 | 6,87 |
| o,1 µgBe | 4,75 | 5,50 | 5,12 |
| 1 µgBe | 5,75 | 9,00 | 7,37 |
| 1o µgBe | 3,75 | 7,75 | 5,75 |


%
70
60
50
40
30
20
10
0


%
70
60
50
40
30
20
10
0

Tier Nr. 8
Geschlecht W
Exposition 72 Tage

Transformierte Zellen

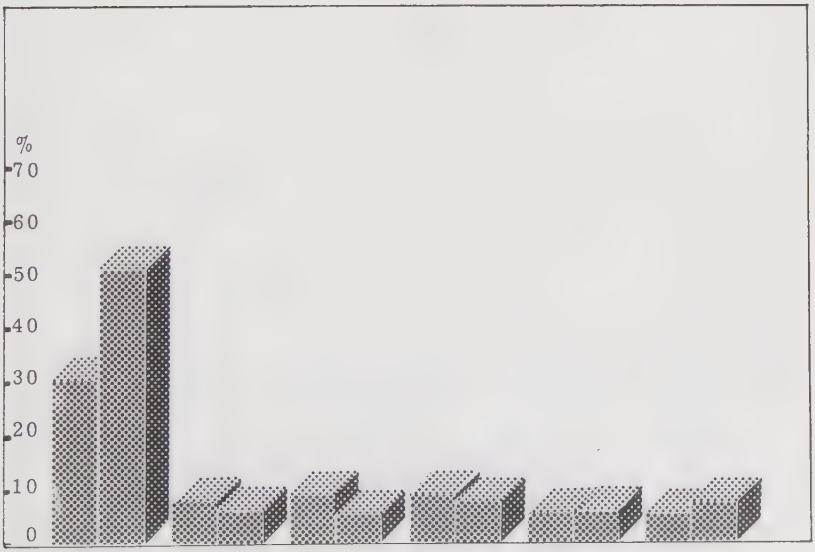
| Versuch 11 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 55,25 | 39,50 | 47,37 |
| NaCl | 12,15 | 11,22 | 11,68 |
| 0,01 µgBe | 9,66 | 10,50 | 10,08 |
| 0,1 µgBe | 5,16 | 5,25 | 5,21 |
| 1 µgBe | 3,06 | 4,75 | 3,91 |
| 10 µgBe | 3,93 | 7,66 | 5,79 |

Tier Nr. 9
Geschlecht M
Exposition 72 Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 12 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 30,04 | 51,00 | 40,52 |
| NaCl | 7,82 | 6,00 | 6,91 |
| 0,01 µgBe | 9,00 | 5,25 | 7,12 |
| 0,1 µgBe | 8,59 | 7,25 | 7,92 |
| 1 µgBe | 5,25 | 5,44 | 5,34 |
| 10 µgBe | 5,00 | 7,00 | 6,00 |

%
70
60
50
40
30
20
10
0


%
70
60
50
40
30
20
10
0

Tier Nr. 10
Geschlecht M
Exposition 72 Tage

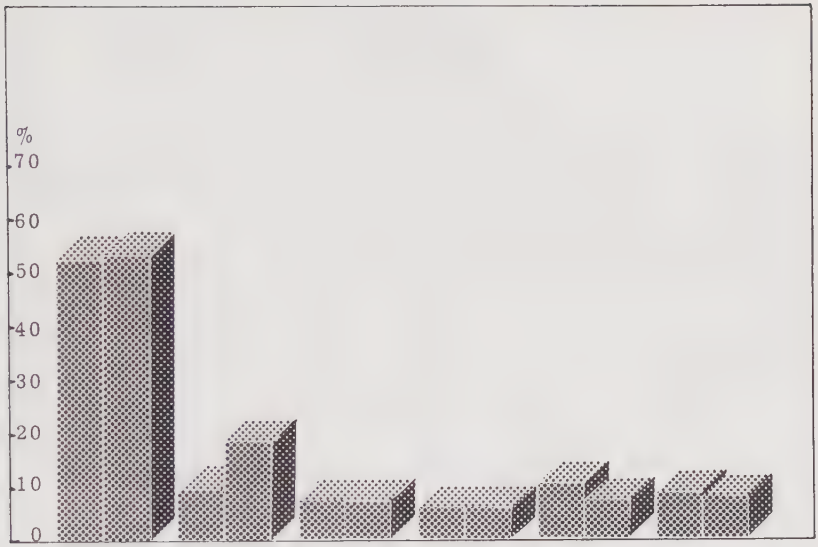
Transformierte Zellen

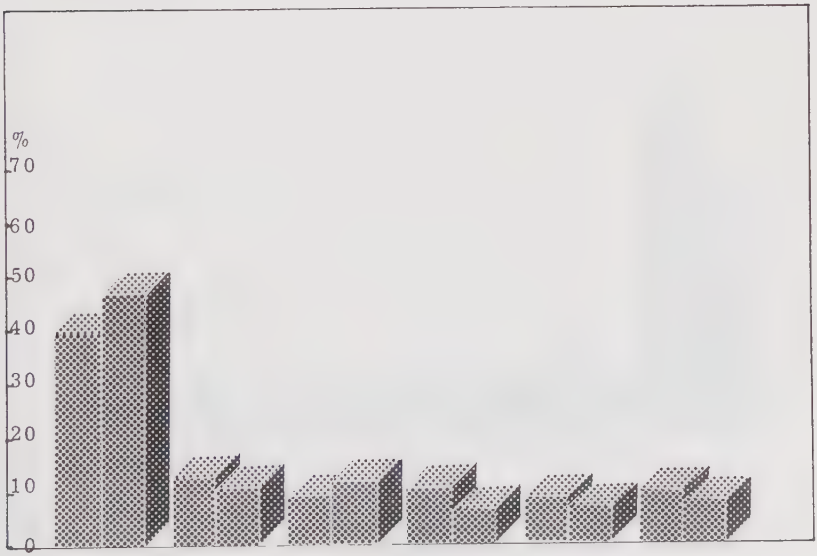
| Versuch 13 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 52,25 | 53,50 | 52,87 |
| NaCl | 9,50 | 18,25 | 14,00 |
| 0.01 µgBe | 7,00 | 7,00 | 7,00 |
| 0.1 µgBe | 4,75 | 4,75 | 4,75 |
| 1 µgBe | 10,25 | 7,00 | 8,62 |
| 10 µgBe | 8,25 | 7,75 | 8,00 |

Tier Nr. 11
Geschlecht M
Exposition 72 Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 14 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 39,82 | 46,19 | 43,00 |
| NaCl | 12,36 | 10,28 | 11,32 |
| 0,01 µgBe | 8,85 | 11,25 | 10,05 |
| 0,1 µgBe | 10,00 | 6,52 | 8,26 |
| 1 µgBe | 8,25 | 6,61 | 7,34 |
| 10 µgBe | 9,75 | 7,80 | 8,77 |

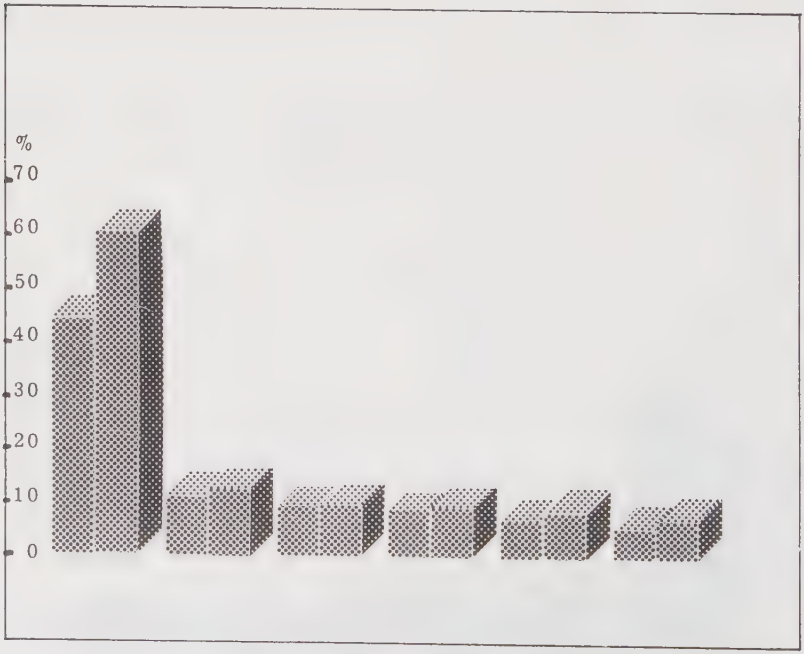

%
70
60
50
40
30
20
10
0


%
70
60
50
40
30
20
10
0

Tier Nr. 12
Geschlecht W
Exposition 72 Tage

Transformierte Zellen

| Versuch 15 | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $b_I, b_{II}$ in % | $\bar{x}$ von $a_I, a_{II}, b_I, b_{II}$ in % |
|---|---|---|---|
| PHA | 44,00 | 60,54 | 52,27 |
| NaCl | 10,94 | 12,25 | 11,59 |
| 0,01 µgBe | 8,89 | 9,75 | 9,32 |
| 0,1 µgBe | 8,34 | 9,00 | 8,67 |
| 1 µgBe | 6,65 | 8,41 | 7,53 |
| 10 µgBe | 5,10 | 7,15 | 6,12 |



# VI. LITERATURVERZEICHNIS


1. ASTALDI, G.: Das Phytohämagglutinin und das Problem des Lymphozyten. Med. Klinik 59, Nr.1o, 368 - 37o (1964)

2. BANDTEL, K.-J.: Beryllium und Lymphozytentransfor.-mation. Inaugural Dissertation a.d. Universität Tübingen 1975

3. BAUER, B.A.: Ein Abriß der medizinisch arbeitshygienisch bedeutsamen Ergebnisse der Erforschung von Berylliumwirkungen und Untersuchung der Stimulierbarkeit von Lymphozyten eines Probantenkollektivs mit beruflichem Berylliumkontakt mittels des Lymphozytentransformationstestes. Inaugural Dissertation a.d. Universität Tübingen 1982.

4. BEKANNTMACHUNG des Bundesministeriums für Arbeit (BMA) vom 8.Aug.1972, III b 4 - 3745. 81-3436/72

5. BELMAN, S.: Beryllium-Binding of Epidermal Constituents. J. Occup. Med. 2, 175-183 (1969)

6. BERENDT, H.: Internist, 15, 397 (1974)

7. BOMAN, A., WAHLBERG, I.E., HAGELTHORN, G.: Sensitizing Potential of Beryllium,

Copper and Molybdenum Compounds Studied by the Guinea Pig Maximization Method.
Contact Dermatitis 5/5, 332 - 333 (1979)

8. BRANDIS, H.: Einführung in die Immunologie. 1. Aufl. Stuttgart: G. Fischer 1975

9. BROCKHAUS der Neue, 6. Aufl. Bd.1, S.278 (1978)

10. BURNET, M.: Körpereigene und körperfremde Substanzen bei Immunprozessen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1973

11. CLARY, J.J. und STOKINGER, H.E.: The Mechanism of Delayed Biological Response Following Beryllium-Exposure.
J. Occup. Medizine 15, 255-259 (1973)

12. CONRADI, C., BURRI, P.H., KAPANCI, Y., ROBINSON und WEIBEL, E.R.: Lung Changes After Beryllium Inhalation.
Arch. Environ. Health, 23, 348 (1971)

13. CROSSMON, G.C. und VANDERMARK, W.C.: Microscopic Observations Correlating Toxicity of Beryllium Oxyde with Crystal Structure.
AMA Arch. Ind. Health 9, 481-487 (1954)

14. CURTIS, G.H.: Cutaneous Hypersensitivity Due to Beryllium. A Study of Thirteen Cases.
Arch. Dermatol. Syphilol. 64, 470-482 (1951)

15. CURTIS, G.H.: The Diagnosis of Beryllium Disease, with Special Reference to the Patch - Test.
AMA Arch. Ind. Health 19, 15o - 153 (1959)

16. DE NARDI, J.M.: Long-Term Experience with Beryllium Disease.
AMA Arch. Ind. Health 19, 11o - 116 (1959)

17. DEODHAR, S.D., BARNA, B. und VAN ORDSTRAND, H.S.: A Study of the Immunologic Aspects of Chronic Berylliosis.
Chest 63, 3o9 - 313 (1973)

18. DEUTSCH, E. und GEYER, G.: Laboratoriumsdiagnostik.
1. Aufl. Berlin: Steinkopff 2o3, 1969

19. DUTRA, F.R., LARGENT, E.J., CHOLAK, J., HUBBARD, D.M., ROTH, J.L.: Persistence of Beryllium in Lungs after Inhalation of Dust.
AMA Arch. Ind. Health 4, 65 - 73 (1951)

2o. EDITORIAL: The Toxicity of Beryllium.
The Lancet 26o, 1, 1357 - 1358 (1951)

21. EL ARABY, I.I., CHERNESKY, M.A., DENT, P.B.: Inhibition of Antigen and Mitogen-Induced Lymphocyte Transformation by Fetal Calf Serum.
Can. J. Microbiol. 23/1o, 1482-1485 (1977)

22. FA. THOMAE, Biberach: Persönliche Mitteilung

23. GARDNER, L.U. und HESLINGTEN, H.F.:
Osteosarcoma from Intravenous Beryllium Compounds in Rabbits.
Fed. Proc. 5, 221 (1946)

24. GEE, J.B.L., SMITH, G.J.W., MATTHAY, R.A., ZORN, S.K.:
Environmental Lung Disease:
Reticuloendothelial Cells.
Res. J. Reticuloendothel. Soc. 22/3
231 - 242 (1977)

25. GOERING, H.D., AGATHA, G., SCHUBERT, H., SCHWALM, I.:
Ein Beitrag zur Testung wasserunlöslicher Antigene im LTT.
Derm. Mschr. 163/3, 213-216 (1977)

26. GOERING, H.D., SCHWALM, I., AGATHA, G., SCHUBERT, H.:
Die Antigentestung mit gefrierkonservierten Lymphozyten im LTT und LMHT.
Derm. Mschr. 163/3 217 - 219 (1977)

27. GROPP, A. und FISCHER, R.:
Ergebnisse der Züchtung von Lymphozyten in vitro.
Klin. Wschr. 44/12 666 - 669 (1966)

28. HALL, T.S., WOOD, C.H., STOECKLE, J.D., TREPPER, L.B.:
Case Data from Beryllium Registry.
AMA Arch. Ind. Health 19, 18/1oo - 21/1o3 (1959)

29. HALL, R.H., SCOTT, J.K., LASKIN, S., STROUD, C.A., STOKINGER, H.E.:
Acute Toxicity of Inhaled Beryllium:
III. Observations correlating Toxicity

with Physicochemical Properties of Berylliumoxide Dust.
Arch. Ind. Hyg. and Occup. Med. 2 25, (195o)

3o. HANIFIN, J.M., EPSTEIN, W.L., CLINE, M.J.:
In vitro Studies of Granulomatous Hypersensitivity to Beryllium.
J.. Invest. Dermatol. 55 284 - 288 (197o)

31. HARD, G.C., SCILLETER, D.N. und REINER, E.:
Exp. Mol. Pathol. 27 197 (1977)

32. HARDY, H.L.: Beryllium Disease: A Continuing Diagnostic Problem.
Amer. J. Med. Sciences 242 15o-156 (1961)

33. HARDY, H.L.: Medical Control of Beryllium, Discussion of Paper by Dr. Zielinsky.
AMA. Arch. Ind. Health 19 121/2o3 - 122/2o4 (1959)

34. HARINA, B.M., GILL, T.J.III, RABIN, B.S., TAYLOR, F.H.:
A Statistical Analysis of Human Lymphocyte Transformation Data.
J. Immunogenet. 6/3 185 - 196 (1979)

35. HART, B.A., PITTMANN, D.G.:
The Uptake of Beryllium by the Alveolar Macrophage.
Res. J. Reticuloendothel. Soc. 27/1 49 - 58 (198o)

36. HASAN, F.M., KAZEMI, H.:
Progress Report. US Beryllium Case

Registry 1972.
Am. Review Respir. Disease 1o8
1252 - 1253 (1973)

37. HEITMANN, H.J.: Zur Methodik der Lymphozytenkultur als Allergie-Test.
Hautarzt 18. Jrg., Heft 14, 152-156 (1967)

38. HEITMANN, H.J.: Vereinfachte Methodik der Lymphozytenkultur als Allergie-Test. Mikrovollblutmethode.
Hautarzt 18. Jrg. Heft 1o, 459 - 461 (1967)

39. HENDERSON, W.R., FUKUYAMA, K., EPSTEIN, W.L. and SPITLER, L.E.:
In vitro Demonstration of the Delayed Hypersensitivity with Berylliosis.
J. Invest. Dermatol. 58, 5-8 (1972)

4o. HENSCHLER, D.: Mitteilung XII d. deutschen Forschungsgemeinschaft. Komm. z. Prüfg. gesundheitsschädlicher Arb. Stoffe.
H. Boldt-Verlag, Boppard/Rh 1976

41. HUBER, H., HUBER, C.:
Grundlagen der Lymphozytenkultur.
Dtsch. Med. Wschr. 8. Jrg., 7, 36o - 363 (1966)

42. ILONEN, J., LANNING, M., HERVA, E., SALMI, A.:
Lymphocyte Blast Transformation Responses in Measles Infection.
Scand. J. Immunol. 12/5 383 - 391 (198o)

43. ILONEN, J.: Lymphocyte Blast Transformation Response of Seropositive and Seronegative Subjects to Herpes Simplex Rubella, Mumps and Measles Virus Antigens. Acta Pathol. Microbiol. Scand.; Sect. C Immunol. 87/2 151 - 157 (1979)

44. ISRAEL, H.L., SONES, M.: The Differentation of Sarcoidosis and Beryllium Disease. AMA Arch. Ind. Health 19 16o - 163 (1959)

45. JANDER, G., BLASIUS, E.: Einführung in das anorganische chemische Praktikum. S. Hirzel Verlag Stuttgart, 9. Aufl. 449 (1971)

46. JONES, J.M., AMOS, H.E.: Contact Sensivity in vitro: Activation of Actively Allergized Lymphocytes by a Beryllium Complex. Int. Arch. Allergy 46, 161 - 171 (1974)

47. KAUFMANN, A.R.: Uses of Beryllium and its Compounds. AMA Arch. Ind. Health 19, 91-93 (1959)

48. KING, M.E.: NASA Doc. N. 62 - 1o124 (1961)

49. KING, M.E., SHEFNER, A.M., EHRLICH, R.: Ind. Med. Surg. 33, 566 (1964)

5o. KLEMPERER, F.W., MARTIN, A.P., VAN RIPER, J.: Beryllium Excretion in Humans. AMA Arch. Ind. Health 4, 251-6 (1951)

51. LEVINE, S., SOWINSKI, R.:
Lymphocytic Inflammation Produced by Intracerebral Implantation of Zinc and other Metals.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 37/5 471 - 478 (1978)

52. LING, N.R.: Lymphocyte Stimulation.
1. Aufl. Amsterdam, Noth-Holland-Publishing Company 1968

53. LÜTZEN, L.: bei der Fa. Thomae, Biberach, persönliche Mitteilung

54. MARX, J.J.jr., BURRELL, R.:
Delayed Hypersensitivity to Beryllium Compounds.
J. Immunol. 111, 2, 59o-98 (1973)

55. MERKBLATT des Bundesministriums für Arbeit
Nr. 32
Erkrankungen durch Beryllium und seine Verbindungen.
US / 5.Lfg. IX. 69 5-7 (1969)

56. MINDEN, H., ROTHE, R.:
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Berylliumvergiftung.
Int. Arch. Gewebepathol. Gewerbehyghiene 21: 4o8-418 (1965)

57. NIEMÖLLER, H.-K.: Über den Beryllium-Hauttest nach Curtis und seine Modifikationen.
Int. Arch. Gewebepathol. 19 27 - 35 (1962)

58. PAYNE, J.E., MEYER, J.H., MACPERSHON, J.G., et.al.:
The Value of Lymphocyte Transformation in Carcinoma of the Colon and Rectum.
Surg. Gynecol. Obstet. 15o/5 687-693 (198o)

59. PEYTON, M.F., WORCESTER, J.:
Exposure Data and Epidemiology of the Beryllium Case Registry 1958.
AMA Arch. Ind. Health 19 94-99 (1959)

6o. PILLARSETTI, S.G., LEE, V.W., CHIANG, T., DEODHAR,S.D.:
Experimental Beryllium Lung Disease: Role of Immune Mechanism
Fed. Proc. 37/3 (1978)

61. PLOUFFE, J.F., SILVA, J., FEKETY, R., BAIRD, I.:
Cereprospinal Fluid Lymphocyte Transformations in Meningitis.
Arch. Intern. Med. 139/2 191-194 (1979)

62. RABATIC, S., DEKARIS, D.:
Simple Phase-Contrast Microscopy Test for Human Lymphocyte Transformation Induced by Mitogens or Antigens.
Acta Med. Iugosl. 33/4 363-372 (1979)

63. REES, P.J.:
Unusual Course of Beryllium Lung Disease.
Br. J. Dis. Chest 73/2 192 - 194 (1979)

64. REEVES, A.L., DEITCH, D., VORWALD, A.J.:
Beryllium Carcinogenesis. I. Inhalation Exposition to Beryllium Sulfate Aerosol.
Cancer Res. 27 439 - 445 (1967)

65. REEVES, A.L., VORWALD, A.J.:
Beryllium Carcinogenesis. II. Pulmonary Deposition and Clearence of Inhaled Beryllium Sulfate in the Rat.
Cancer Research 27, 446 - 451 (1967)

66. REEVES, A.L.: Beryllium in the Environment.
Clin. Toxicol. 1o/1 37 - 48 (1977)

67. RICK, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie.
2. Aufl. Berlin, Springer 1972.

68. ROCKLIN, R.E., MEYERS, O.L., DAVID, J.R.:
An In Vitro Assay for Cellular Hypersensitivity in Man.
J. Immunol. 1o4, 95 - 1o2 (197o)

69. ROSSO DI SAN SECONDO, V.E.M., MILANI, S., FORTIS, C., et. al.:
The Variability of Lymphocyte Transformation Tests.
Transplant. Proc. 11/2 1379-138o (1979)

7o. ROTHE, R., MINDEN, H.:
Einfluß von Beryllium auf verschiedene Fermente in vitro.
Int. Arch. Gewebepathol. Gewerbehygiene 21, 161 - 166 (1965)

71. SALO, M., MERIKANTO, J., ESKOLA, J., et al.:
Impaired Lymphocyte Transformation After Accidential Trauma.
Acta Chir. Scand. 145/6 367-372 (1979)

72. SANDER, O.A.: Chronic Berylliosis in the Neon Sign Industry.
AMA Arch. Ind. Health 3 565 - 568 (1951)

73. SANDERS, C.L., CANNON, W.C., POWERS, G.J., ADEE, R.R., MEIER, D.M.:
Arch. Environ. Health, 3o 546 (1975)

74. SCHEPERS, G.W.H.: Neoplasia Experimentally Induced by Beryllium Compounds.
Progr. Exptl. Tumor Res. 2, 2o3-44 (1961)

75. SCHEPERS, G.W.H.: Chronic Berylliosis
Int. Arch. Gewebepath. 19, 1-26 (1962)

76. SCHEPERS, G.W.H.: Biological Action of Beryllium Reaction of the Monkey to Inhaled Aerosols.
Ind. Medicine and Surgery Jan. 64 1-16

77. SCHÜRMANN, D.: Zwei Beryllium-Todesfälle und ihre Lehren.
Zbl. Arbeitsmedizin 1o, 139 - 41 (196o)

78. STEIDLE, H.: Arch. exper. Path. Pharmakol. 187 533 (1937)

79. STERNER, J.M., EISENBUD, M.:
Epidemiology of Beryllium Intoxication.
AMA Arch. Ind. Health 4 123 - 151 (1951)

8o. STIEFEL, T., SCHULZE, K., ZORN, H., TOELG, G.:
Toxicokinetic and Toxicodynamic Studies of Beryllium.
Arch. Toxicol. 45/2 81-92 (198o)

81. STOECKLE, J.D., HARDY, H.L., WEBER, A.L.:
Chronic Beryllium Disease. Long - Term Follow-Up of Sixty Cases and Selective Review of the Literature.
Amer. J. Med. 46, 545 - 61 (1969)

82. STOECKLE, J.D., KAZEMI, H., CHAMBERLIN, R.:
Exposure, Complaints, Chest Film Abnormalities and Lung Function - Tests among Beryllium Workers.
J. Occup. Med. 15 3o1 (1973)

83. SVEJGAARD, E., MORLING, N., SVEJGAARD, A., VEIEN, N.K.:
Lymphocyte Transformation Induced by Nickel Sulphate: An In Vitro Study of Subjects with and without a Positive Nickel Patch Test.
Acta Derm.-Venereol. 58/3 245-25o (1978)

84. TEPPER, L.B.:
Beryllium.
CRC Critical Review on Toxicol. 235-59 (1972)

85. TOOGOOD, J.H., KHAN, R., LEFCOE, N.M., et. al.:
Diagnostic Value of Lymphocyte Trans-

formation in Pigeon Breeder's Lung (PBL) Using Fresh and Cryopreserved Cells.
Bull. Int. Union Tuberc.
54/2 188 - 19o (1979)

86. TSCHUNKE, K., FOLESKY, A.:
Hautarzt, 2o 4o3 (1969)

87. VAN CLEAVE, C.D., KAYLOR, C.T.:
Distribution, Retention and Elimination of Beryllium in the Rat after Intratracheal Injection.
AMA Arch. Ind. Health 11, 375 - 392 (1955)

88. VANDENBARK, A.A., FERRO, A.J., BARNEY, C.L.:
Inhibition of Lymphocyte Transformation by a Naturally Occuring Metabolite: 5 - Methylthioadenosine.
Cell. Immunol. 49/1 26-33 (198o)

89. VAN GANSE, W.J., OLEFFE, J., VAN HOVE, W., GROETENBRIEHL, C.:
Study of the Immunologic Aspects of Beryllium Poisoning.
Chest Disease, Thoracic Surgery and Tuberculosis 15 2357 - 27o4 (1972)

9o. VAN ORDSTRAND, H.S., HUGHES, R., CARMODY, M.G.:
Chemical Pneumonia in Workers Extracting Beryllium Oxide: Report of 3 Cases.
Cleveland Clin. Quart. 1o 1o (1943)

91. VAN ORDSTRAND, H.S.:
Diagnosis of Beryllium Disease.
AMA Arch. Ind. Health 19 157 - 159 (1959)

92. VASILYEVA, E.V., NIKITINA, L.S., ORLOVA, A.A.:
Concentration of Immunoglobulins in Berylliosis.
J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 21/3 254 - 26o (1977)

93. VEIEN, N.K., SVEJGAARD, E.:
Lymphocyte Transformation in Patients with Cobalt Dermatitis.
Br. J. Dermatol. 99/2 191 - 196 (1978)

94. VEIEN, N.K., SVEJGAARD, E., MENNE, T.:
In Vitro Lymphocyte Transformation to Nickel: A Study of Nickel-Sensitive Patients Before and After Epicutaneous and Oral Challenge with Nickel.
Acta. Derm.-Venereol. 59/5 447-451 (1979)

95. VORWALD, A.J.: Experimental Pulmonary Cancer Induced by Compounds of Beryllium and other Test Agents.
Am. Cancer Soc. Progr. Pept. E. 253F (1961)

96. WAGNER, W.D., GROTH, D.H., HOLTZ, J.H., MADDEN, G.E., STOKINGER, H.E.:
Comparative Chronic Inhalation Toxicity of Beryllium Ores, Bertrandite and Beryl with Production of Pulmonary

Tumors by Beryl.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 15
1o-29 (1969)

97. WAKSMAN, B.H.: The Diagnosis of Beryllium Disease with Special Reference to the Patch - Test.
AMA Arch. Ind. Health 19 154-159 (1959)

98. WASSILEW, S.W., KOCH, I.: Der Lymphozytentransformationstest bei Patienten mit rezidivierenden Herpes Simplex Hominis - Erkrankungen.
Arch. Dermatol. Res. 262/3
267 - 274 (1978)

99. WILLIAMS, W.J.: Beryllium Disease-Pathology and Diagnosis.
J. Soc. Occup. Med. 27 93 - 96 (1977)

1oo. YAMADA, T., MIZOGUCHI, Y., MONNA, T. et. al.: An Application of the Whole Blood Microculture Technique to the Detection of Lymphocyte Transformation.
Osaka City Med. J. 24/2 155 - 164 (1978)

1o1. ZELLER, J.: Der LTT als "screening"-Untersuchung zur Feststellung einer speziellen Sensibilisierung durch $BeSO_4$.
Inaugural Dissertation, Tübingen 1976

1o2. ZIELINSKI, J.F.: Direct Medical Controls in the Beryllium Industry.

AMA Arch. Ind. Health 19
118/2oo - 12o/262 (1959)

1o3. ZORN, H., DIEM, H.: Die Bedeutung des Beryllium und seiner Verbindungen für den Arbeitsmediziner. Zentralbl. Arbeitsmedizin und Arbeitsschutz 24 3-8 (1974)

1o4. ZORN, H., STIEFEL, Th., DIEM, H.: Zweite Mitteilung Zentralbl. Arbeitsmed. 27 83 (1977)

1o5. ZORN, H.: Die Lymphozytentransformation als biologischer Parameter bei der Exposition gegenüber verschiedenen Metalloxiden und Metallsalzen, aufgezeigt am Beispiel des Beryllium (Be).
Verh. d. Deutsch. Ges. f. Arb.med.
Gentner-Verlag Stuttgart 187 (1978)

1o6. ZSCHUNKE, E., FOLESKY, H.:
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Sensibilisierung gegen Beryllium.
Hautarzt 2o 4o3 - 4o4 (1969)

# LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| 22. März 1951 | Geboren in Stuttgart<br>Eltern: Herbert Krauss<br>Friedel Krauss, geb. Wilhelm |
| Juni 197o | Reifeprüfung am Hegel-Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen |
| Oktober 197o - Oktober 1972 | Studium der Chemie an der Universität Stuttgart |
| April 1972 - April 198o | Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 1o. April 198o | Staatsexamen |
| Mai 198o | Approbation |
| Juni 198o - September 1981 | Zivildienst als Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des Katharinenhospitals Stuttgart |
| Oktober 1981 - dato | Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des Krankenhauses vom Roten Kreuz in Stuttgart |